



Sources naturelles de la résistance contre les nématodes à galles *Meloidogyne javanica* chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Maisara Mukhaïmar Mukhaimar

► To cite this version:

Maisara Mukhaïmar Mukhaimar. Sources naturelles de la résistance contre les nématodes à galles *Meloidogyne javanica* chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.. Génétique des plantes. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA112033 . tel-01265310

HAL Id: tel-01265310

<https://theses.hal.science/tel-01265310>

Submitted on 1 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 145 : SCIENCES DU VÉGÉTAL

Laboratoire: Ecologie, Systématique et Evolution (ESE)

THÈSE DE DOCTORAT

BIOLOGIE

Soutenue le Mercredi 25/03/2015

Par

M. Maisara MUKHAIMAR

**Sources naturelles de la résistance contre les nématodes à galles
Meloidogyne javanica chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana***

Composition du jury :

Directeur de thèse : M. Juergen KROYMANN

Directeur de recherche (CNRS), Université Paris Sud

Rapporteurs : Mme. Régine DELOURME
M. Bruno FAVERY

Directeur de recherche (INRA), Université Rennes 1
Directeur de recherche (INRA), Sophia Antipolis

Examineurs : Mme. Jacqui SHYKOFF

Directeur de recherche (CNRS), Université Paris-Sud

Dédicace

Je souhaite dédier cette thèse aux âmes de deux hommes à qui je dois tout le respect et l'amour, mon père **Mosbah** et mon frère **Musa**,

Ainsi que à deux femmes, pas comme toutes les femmes, ma chère mère **Fatima** et la fleur de ma vie **Nareman**.

Remerciements

Avant d'infliger cette centaine de pages, gorgées de connaissance, je souhaite avant tout adresser quelques lignes pour remercier certaines personnes qui ont fait que ce travail se déroulait dans les meilleures conditions.

J'aimerais d'abord remercier le Consulat Générale de France à Jérusalem, l'Institut Français de Gaza, et la direction des relations internationales de l'université Paris Sud XI qui m'ont attribué la bourse pour réaliser ma thèse. Je souhaite ensuite remercier le ministère de l'agriculture palestinien, ainsi que le centre national palestinien de recherches agronomique (NARC) où je travaille, de m'avoir facilité les procédures administratives relatives à mes déplacements entre la Palestine et la France.

Je souhaite aussi remercier les directeurs de l'unité de l'Ecologie, Systématique et Evolution (ESE), Monsieur Paule LEADLEY, et Madame Jane LECOMTE pour leur disponibilité inconditionnelle.

J'aimerais remercier vivement Monsieur Bruno FAVERY et Madame Régine DELOURME pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et pour toutes les heures qu'ils ont consacrées à juger et critiquer constructivement le manuscrit. Ils ont également contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer et enrichir la qualité de cette thèse, et je leur en suis très reconnaissant.

Je voudrais remercier particulièrement Madame Jacqui SHYKOF, la présidente de mon jury de thèse, pour sa présence et son soutien continu administrativement, moralement, et par parfois scientifiquement tout au long de mon parcours scientifique au sein de l'université Paris sud XI. Merci beaucoup pour tout Jacqui.

Juergen, mon directeur de thèse, mon meilleur pote, mon confident, bref je ne sais plus laquelle tu préfères, pour moi tu étais tout ça et parfois plus. Je te remercie vivement pour la confiance que tu m'as accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, et pour toutes les heures que tu as consacrées à diriger cette recherche. Ces trois ans de thèse n'auraient jamais été pareilles sans ta présence, ta disponibilité inconditionnelle, tes multiples conseils, les discussions, les pauses café, les e-mails à minuit et même plus tard des fois, pour tout ce que tu as donné, et pour tout ce qu'on a partagé, je te remercie une autre fois, et j'espère que on va coopérer dans le futur proche et plus tard aussi.

Marina, le cœur battant de l'équipe, je tiens vraiment te remercier pour toute la connaissance que tu m'as appris notamment les techniques de la biologie moléculaire. Je ne jamais oublié ta patience, tes critiques positives et également, je n'oublierai jamais le biscuit (très bon mais parfois un peu solide). Merci Marina pour tout.

Je voudrais remercier aussi, Béatrice pour le support technique pendant les analyses nématologiques, et aussi un grand merci à Martine, Nathalie, Emanuele, Sandrine pour le soutien administratif.

Je voudrais remercier toutes ces personnes dans l'ombre, Lionel, Amandine et Alain, de la serre expérimentale.

J'aimerais remercier également Bertrand Gakière, et Elodie Louchez, qui ont pris le temps de relire et corriger linguistiquement cette thèse.

Je aimerais aussi remercier Ghayas, mon cher ami, merci pour ta disponibilité et ta générosité inconditionnelle et merci aussi pour les bons moments qu'on a partagé ensemble.

Malika, mon amie, ma collègue, je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu étais toujours là pour moi, tu as su me soutenir dans les moments les plus difficiles. On a su surmonter tous les deux des moments difficiles et savourer les bons moments également, merci Malika.

Je voudrais également remercier mon cher ami Reda avec qui on a partagé très bons moments, le travail pendant les week-ends, les repas pendant le mois de Ramadan, les pauses café et beaucoup des bonnes gestes que je ne les jamais oubliées, merci Reda.

Je ne saurais terminer sans remercier aussi, Fatima, Mustafa, Zeid, Heider, Zohreh, Wasseem, Safwan, Taha, Rihab, Ahmad, et tous les membres de l'unité ESE.

J'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à ma mère Fatima, ma femme Nareman, mes enfants Kareem, Farah, Hala et Mohammed, mes frères et mes sœurs pour leur patience de mon absence pendant les trois ans de la thèse.

Table de Matières

1	Introduction générale.....	1
1.1	Nématodes phytoparasites.....	2
1.1.1	Lieux de parasitismes.....	2
1.1.2	Systématique des nématodes à galles.....	3
1.1.3	Morphologie des nématodes à galles.....	4
1.1.4	Les espèces de genre <i>Meloidogyne spp.</i> et leur distribution.....	5
1.1.5	Modes de la reproduction.....	6
1.1.6	Cycle de vie.....	6
1.1.7	L'éclosion.....	8
1.1.8	Attraction des nématodes et la pénétration.....	8
1.1.9	Modifications de l'expression des gènes de plantes en réponse à l'infection de nématodes.....	9
1.1.10	Symptômes causés par les nématodes à galles.....	12
1.1.11	Impact économique de nématodes à galles.....	13
1.1.12	Gestion de nématodes phytoparasites.....	14
1.1.12.1	Les pratiques culturales.....	14
1.1.12.2	Les méthodes physiques.....	14
1.1.12.3	La lutte biologique.....	15
1.1.12.4	La lutte chimique.....	16
1.1.12.5	La lutte génétique.....	16
1.1.13	Cartographie de gènes et QTL de résistance.....	17
1.1.14	Gènes de résistance et mécanismes de défense.....	18
1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	21
1.2.1	Caractéristiques.....	21
1.2.1.1	Botanique.....	21
1.2.1.2	Distribution géographique.....	21
1.2.1.3	Développement.....	22
1.2.1.4	Génétique.....	22
1.2.2	La variation naturelle : Les accessions d' <i>Arabidopsis</i>	23
1.2.3	La variation phénotypique.....	23
1.2.4	Locus de caractères quantitatifs – QTL.....	24
1.2.5	Populations de cartographie.....	24
1.3	Les objectifs de la thèse.....	28
2	Matériels et Méthodes.....	30
2.1	Culture d' <i>Arabidopsis</i>	30
2.2	Source permanente de <i>Meloidogyne javanica</i>	31
2.3	Préparation de l'inoculum.....	32
2.4	L'inoculation d' <i>Arabidopsis</i> par des nématodes <i>M. javanica</i>	32
2.5	Evaluation phénotypique : l'analyse nématologique.....	32
2.6	Croisements de plantes.....	33
2.7	Extraction d'ADN.....	34

2.8	Amplification par PCR.....	35
2.9	Electrophorèse sur gel d'agarose Métaphor.....	35
2.10	Génotypage de plantes par microsatellites.....	36
2.11	Génotypage par séquençage.....	36
2.12	Analyses statistiques.....	38
	Résultats.....	39
3.1	Analyse de la variation génétique naturelle de la résistance.....	40
3.1.1	Introduction.....	40
3.1.2	Résultats.....	41
3.1.3	Discussion.....	45
4	La relation entre le nombre de galles et le nombre de masses d'œufs.....	48
4.1	Introduction.....	48
4.2	Résultats.....	48
4.3	Discussion.....	51
5	Cartographie de QTL de la résistance.....	54
5.1	Introduction.....	54
5.2	Résultats.....	54
5.3	Discussion.....	63
6	Confirmation du QTL2 et cartographie fine.....	65
6.1	Introduction.....	65
6.2	Résultats.....	65
6.2.1	Génération d'une population pour la cartographie fine.....	65
6.2.2	Identification des recombinants dans la génération F2 pour la cartographie fine de QTL2.....	66
6.2.3	Vérification du QTL2.....	69
6.2.4	Cartographie des points de recombinaison.....	75
6.3	Discussion.....	79
7	Conclusion et perspectives.....	82
8	Références bibliographiques.....	88

Liste des Figures

1. Illustration des différents lieux de parasitisme chez les nématodes phytoparasites dans les racines.....	3
2. Femelles matures de nématodes à galles <i>Meloidogyne javanica</i> sur des racines d' <i>Arabidopsis</i> et de la tomate.....	4
3. Juvénile de <i>Meloidogyne javanica</i>	5
4. Carte de la distribution planétaire de <i>M. javanica</i>	6
5. Cycle de vie de nématodes à galles et leur voie de pénétration dans les racines.....	7
6. Masses d'œufs de <i>M. javanica</i> sur les racines de tomates.....	7
7. Symptômes causées par les nématodes à galles <i>Meloidogyne javanica</i>	13
8. Les protéines <i>R</i> du type CC-NBS-LRR.....	19
9. Modèle générale de rôle de la protéine Mi-1.....	20
10. Carte de la distribution géographique d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
11. L'inducteur de l'haploïdie.....	26
12. Population RIL issues d'un croisement entre deux accessions différentes d' <i>Arabidopsis</i>	27
13. Culture d' <i>A. thaliana</i>	30
14. Des racines d' <i>A. thaliana</i> prêtes à l'analyse nématologique.....	33
15. Position des organes floraux avant croisement chez <i>A. thaliana</i>	34
16. Le nombre moyen (\pm SEM) de galles provoquées par <i>M. javanica</i> sur les racines de 6 accessions d' <i>Arabidopsis</i> dans deux expériences indépendantes.....	42
17. Des galles provoquées par <i>M. javanica</i> sur les racines de différentes accessions d' <i>Arabidopsis</i>	44
18. Relations entre le nombre de masses d'œufs et le nombre de galles dans les lignées recombinantes inoculées à deux doses différentes de juvéniles de nématodes.....	49
19. Le nombre de masses d'œufs par galle, après inoculation avec deux doses différentes de juvéniles de nématodes, pour 4 lignées recombinantes.....	50
20. Distribution de données dans l'expérience de la cartographie de QTL.....	54
21. QTL de résistance contre les nématodes à galles <i>M. javanica</i> en utilisant WinQTLcart.....	59
22. Scan bidimensionnel du génome d' <i>Arabidopsis</i> en utilisant R/qtl.....	61
23. Carte génétique des plantes F1 issues du croisement entre RILs DE022 et DE073.....	66
24. Nombres moyennes de galles par génotype pour 13 lignées F3 recombinantes issues d'un croisement entre DE022 et DE073.....	72
25. Différences standardisées de nombres moyennes de galles pour 13 lignées F3 recombinantes issues d'un croisement entre DE022 et DE073.....	73
26. Vérification de la présence d'un QTL pour la résistance contre <i>M. javanica</i> sur le chromosome 2 d' <i>Arabidopsis</i>	74
27. Comparaison des différences standardisées pour le nombre de galles pour 4 lignées ségrégantes dans deux expériences indépendantes.....	75
28. La relation entre la présence ou l'absence d'une différence de nombre de galles entre les génotypes des lignées Q2A/83 et Q2/92 et leurs points de recombinaison.....	77

Liste des Tableaux

1. La systématique de nématodes à galles <i>Meloidogyne javanica</i>	4
2. Certains produits de gènes sécrétés des glandes œsophagiennes de deux espèces de nématodes à galles.....	9
3. Estimation des pertes de rendements causées par les nématodes à galles.....	13
4. Le calendrier de l'ajout de l'engrais chimique « Hydrokani™ » en fonction de l'âge de plante.....	31
5. Les marqueurs utilisés dans la cartographie fine par séquençage.....	37
6. Le nombre de galles provoquées par <i>M. javanica</i> sur les racines de 6 accessions d'Arabidopsis...	43
7. Marqueurs utilisés pour la cartographie de QTL chez la population RIL Da(1)-12 x Ei-2	55
8. Nombre de galles provoquées par les nématode à galles <i>Meloidogyne javanica</i> sur les racines des lignées de la population RIL Da(1)-12 x Ei-2 utilisées pour la cartographie de QTL de résistance.....	56
9. Marqueurs associés à une différence en nombre de galles entre génotypes, selon d'ANOVA en utilisant la population RIL Da(1)-12 x Ei-2	57
10. Nombre de galles de <i>Meloidogyne javanica</i> sur les racines d'Arabidopsis aux 10 combinaisons de génotypes aux 4 marqueurs MSAT2.4, MSAT3.19, MSAT4.25 et C5P81.....	58
11. Les paramètres de contrôle pour le modèle standard de la cartographie d'intervalle composite en différentes combinaisons et leurs effets sur la signification des QTL.....	60
12. Des modèles pour tester l'existence des QTL supplémentaires sur les chromosomes 2 et 3 en utilisant la méthode des imputations multiples implémentée en R/qtl.....	62
13. Marqueurs moléculaires utilisés en cartographie fine de QTL2.....	67
14. Génotypage initiale des 196 plantes F2 issues du croisement DE022 x DE073.....	68
15. Regroupement des plantes F2 issues du croisement DE022 x DE073 selon leurs génotypes au niveau des marqueurs MSAT2.37 et Msatq2.16.....	69
16. Les génotypes au long du chromosome 2 de 13 lignées F2 utilisées pour la vérification du QTL2...	69
17. Les résultats du comptage de galles sur les racines des lignées recombinées.....	71
18. Les produits PCR utilisés pour la cartographie par séquençage.....	78

1. Introduction générale

Les nématodes phytoparasites attaquent presque tous les cultures qui représentent l'approvisionnement alimentaire du monde (Sasser & Carter, 1985) et sont responsables des pertes de rendement de la production alimentaire mondiale à hauteur de 14%, soit l'équivalent d'une perte économique de plus de 100 milliards de dollars par an (Bélair, 2005).

Les nématodes à galles appartiennent au genre *Meloidogyne*. Ce genre comprend plus de 90 espèces qui sont responsables d'environ 5% des pertes globale de rendement de la production alimentaire. Les quatre espèces principales du genre *Meloidogyne*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita* et *Meloidogyne hapla* sont les parasites les plus répandus dans le monde (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Les juvéniles du genre *Meloidogyne* infectent les racines, se nourrissent des photosynthéates et provoquent la formation de galles. Ils perturbent le système vasculaire de plante dans lequel circulent l'eau, les éléments nutritifs et les photosynthéates, et ils entraînent des infections secondaires par d'autres parasites et agents phytopathogènes.

Le stade infectieux de nématodes à galles, les juvéniles, existent dans le sol ou vivent dans les racines des plantes ce qui rend très difficile le traitement par des pesticides. De plus, les nématicides efficaces sont généralement très toxiques et leur utilisation présente un risque élevé pour la santé humaine et l'environnement (Gustafson, 1993 ; Chitwood, 2003). Par conséquent, de nombreux nématicides sont déjà interdits dans l'UE, les Etats-Unis et dans d'autres pays développés.

Pour ces raisons, le développement des méthodes alternatives à la lutte chimique contre les nématodes phytoparasites est devenu nécessaire et urgent. Ces alternatives doivent être basées d'abord sur le respect de la santé de l'homme et de l'environnement, mais elles doivent aussi être efficaces et durables. Une solution raisonnable pour répondre à ces besoins est l'exploitation de la résistance naturelle chez des espèces sauvages des plantes.

Les travaux décrits dans cette thèse de doctorat visent à explorer la possibilité d'exploiter la variation génétique naturelle de la plante modèle, *Arabidopsis thaliana*, pour trouver des nouveaux gènes de résistance contre le nématode à galles, *M. javanica*.

1.1. Nématodes phytoparasites

Les nématodes phytoparasites sont des animaux vermiformes, les plus souvent microscopiques. Ils ont une morphologie externe similaire, avec un corps en forme d'aiguille et non segmenté, de taille variant de 0,25 à plus de 1 millimètre. Les nématodes phytoparasites possèdent une structure spécialisée appelée stylet. Le stylet est utilisé (i) pour injecter des enzymes dans les cellules et les tissus végétaux des plantes, (ii) et pour en extraire le contenu, d'une façon similaire à celle chez les pucerons (Coyne *et al.*, 2010). Les juvéniles percent la paroi des cellules par des mouvements répétés du stylet, injectant des sécrétions œsophagiennes, puis, après quelques secondes de repos, aspirent le contenu prédigéré des cellules grâce à leur bulbe médian. Les larves peuvent s'alimenter ainsi des cellules épidermiques, des cellules corticales, ou/et des celles du cylindre central de racine mais aussi partie aérienne (Linford, 1937 ; 1942 ; revue par Guiran & Netscher, 1970).

1.1.1. Lieux de parasitismes

Le lieu de parasitisme permet de classer les nématodes phytoparasites en trois catégories principales: (i) les nématodes ectoparasites sont des nématodes qui s'alimentent à la surface des tissus racinaires des plantes. Cette catégorie de nématodes se trouve parmi les genres *Tylenchus*, *Helicotylenchus*, *Dolichodorus*, *Xiphinema* et *Longidorus* (**Figure 1** : 1 - 3, 8 et 9, respectivement). (ii) Des nématodes semi-endoparasites ; chez ces nématodes, seule la partie antérieure du nématode pénètre dans les racines, la partie postérieure restant dans le sol ; par exemple, les genres *Rotylenchulus* et *Tylenchulus* (**Figure 1** : 4 - 7). (iii) Des nématodes endoparasites ; ce groupe peut être divisé en deux sous-groupes: les endoparasites sédentaires et les endoparasites migrateurs. Les endoparasites sédentaires migrent dans le tissu racinaire de plante, établissent un site nourricier, cessent d'être mobiles et s'y alimentent. Ce groupe comporte les nématodes à kyste (ex. *Globodera* spp. ; **Figure 1** : 12) et les nématodes à galles (*Meloidogyne* spp. ; **Figure 1** : 13). Les endoparasites migrateurs sont des nématodes mobiles qui s'alimentent à l'intérieur des tissus racinaires des plantes, par exemple les nématodes des genres *Pratylenchus* et *Radopholus*, et aussi des tissus des tiges tel le genre *Ditylenchus* (**Figure 1** : 14) (Perry & Moens, 2006).

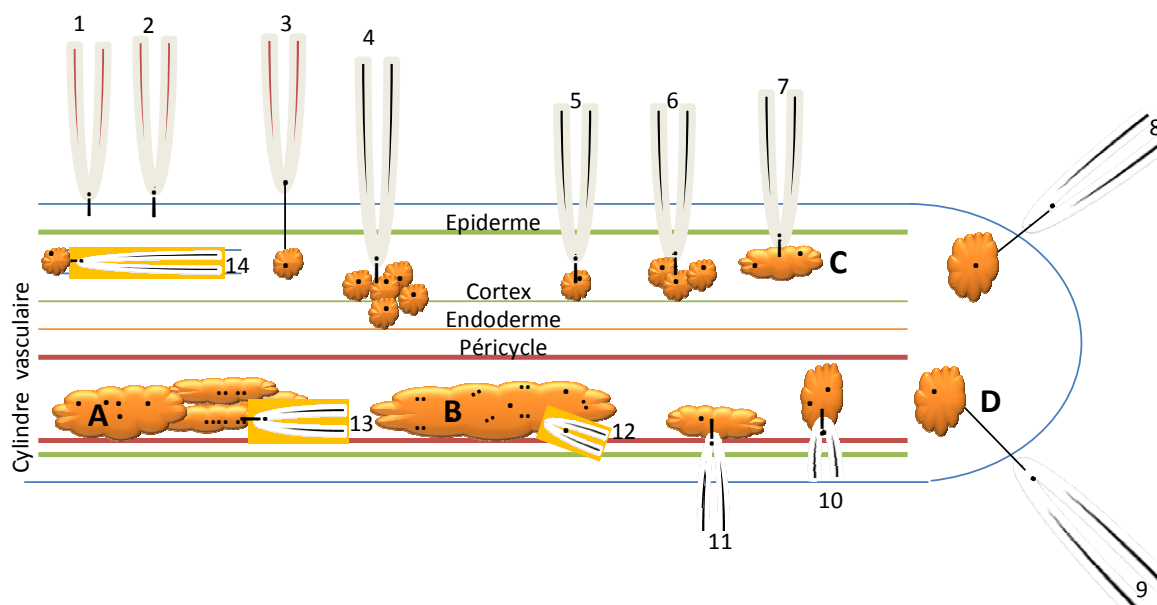


Figure 1. Illustration des différents lieux de parasitisme chez les nématodes phytoparasites dans les racines. **A**, indique les cellules géantes multinucléées induites par les nématodes à galles. **B**, indique le syncytium, constitué par la modification d'une cellule végétale au service d'un parasite, induit par les nématodes à Kyste. **C**, indique des cellules végétales infectées par d'autres espèces des nématodes phytoparasites. **D**, indique le stylet chez les nématodes phytoparasites ; le stylet chez certaines espèces des nématodes ectoparasites est relativement long, ce long stylet permet au nématode de se nourrir des cellules de l'intérieur de l'apex tout en restant à l'extérieur de la racine. On peut remarquer trois catégories des nématodes phytoparasites : **des ectoparasites** qui sont des nématodes qui s'alimentent à la surface des tissus racinaires des plantes telles que, *Tylenchus*, *Helicotylenchus*, *Dolichodorus*, *Xiphinema* et *Longidorus* (**1 - 3**, **8**, et **9**, respectivement) ; **des semi-endoparasites**, chez cette catégorie seule la partie antérieure du nématode pénètre dans les racines, telles que les nématodes des genres *Rotylenchulus* et *Tylenchulus* (**4 - 7**) ; **des endoparasites**, cette catégorie peut être divisée en deux groupes : **des endoparasites sédentaires**, les nématodes de ce groupe migrent dans le tissu racinaire de plante, établissent un site nourricier, cessent d'être mobiles et s'y alimentent. Ce groupe comporte les nématodes à kyste (ex. *Globodera spp.*, **12**) et les nématodes à galles (ex. *Meloidogyne spp.*, **13**) ; **des endoparasites migrants** : des nématodes mobiles qui s'alimentent à l'intérieur des tissus racinaires des plantes, telles que les nématodes des genres *Pratylenchus* et *Radopholus* (**14**). D'après Perry & Moens, 2006.

1.1.2. Systématique des nématodes à galles

Les nématodes à galles sont des animaux de l'embranchement des Nématelminthes du phylum des Nématoda. La classification complète de l'espèce *Meloidogyne javanica* est décrite ci-dessous dans le **Tableau 1** (Treub, 1885 ; Chitwood, 1949).

Tableau 1. La systématique de nématodes à galles *Meloidogyne javanica*. D'après Hunt *et al.*, (2005); <http://nematode.unl.edu/mjav.htm>

Phylum	Nematoda (Cobb, 1919)
Classe	Secernentea (Von Linstow, 1905)
Sous-classe	Diplogasteria (Inglis, 1983)
Ordre	Tylenchida (Thorne, 1949)
Sous-ordre	Tylenchina (Thorne, 1949; Chitwood, 1950)
Super-famille	Hoplolaimidae (Filipjev, 1934)
Famille	Meloidogynidae (Scarbilovich, 1959)
Genre	<i>Meloidogyne</i> (Göldi, 1892)
Espèce	<i>M. javanica</i> (Treub, 1885; Chitwood, 1949)

1.1.3. Morphologie des nématodes à galles

Les nématodes à galles qui ont deux sexes sont sexuellement dimorphiques. Les femelles, intégrées dans le tissu racinaire, sont globuleux avec un mince col (**Figure 2**). Ils ont un diamètre de 0,3 à 0,7 mm. La vulve est sub-terminale et localisée près de l'anus. La cuticule est blanchâtre, mince et annelée. Le stylet est court et modérément sclérifié.

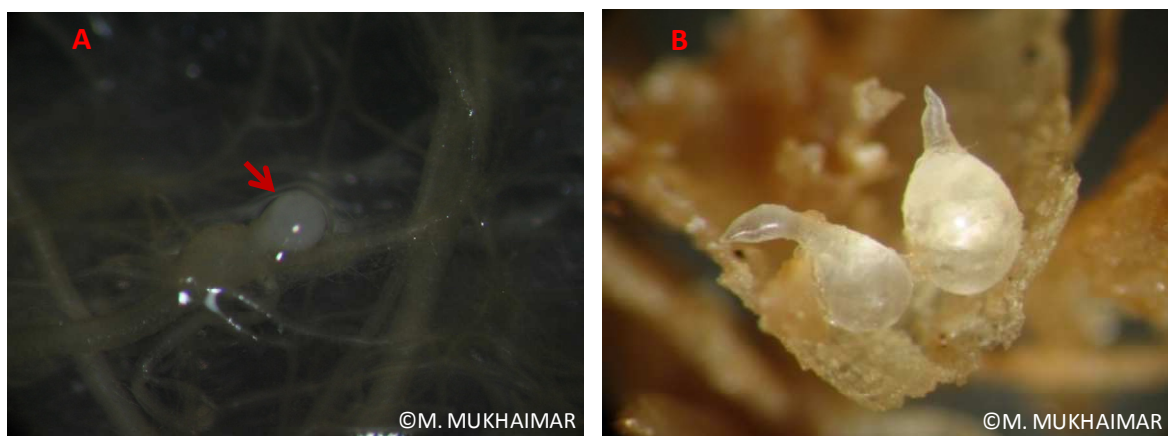


Figure 2. Femelles matures de nématodes à galles *Meloidogyne javanica* sur des racines d'*Arabidopsis* (A) et de la tomate (B). Le grossissement est X4 (A) et X5 (B), respectivement.

Les mâles, adultes après la 4^{ième} mue, sont pelotonnés à l'intérieur des enveloppes cuticulaires des stades précédents. Ils les percent avec leur stylet et quittent la racine pour se déplacer librement dans le sol. Ils sont vermiformes, de 1 à 2 mm de longueur. Ils possèdent un stylet mais il est probable qu'il ne soit pas fonctionnel et que les mâles ne se nourrissent pas, mais vivent sur les réserves contenues dans la paroi

de leur intestin (Guiran & Netscher, 1970). La queue est courte et hémisphérique, les spicules sont robustes et le bursa est absent (Hunt *et al.*, 2005).

Les juvéniles J2 (après la 2^{ème} mue) sont minces, vermiformes, et d'environ 0,45 mm de long (**Figure 3**). Le stylet et le squelette de la région labiale sont faiblement sclérifiés. La queue est conique avec une partie hyaline près de son extrémité (Hunt *et al.*, 2005) .



Figure 3. Juvénile de *Meloidogyne javanica*. (J. Tavoillot, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, autorisation personnelle).

1.1.4. Les espèces de genre *Meloidogyne* spp. et leur distribution

Bien que plus de 90 espèces du genre *Meloidogyne* aient été décrites à ce jour, quatre espèces revêtent une importance économique particulière de la production alimentaire du monde. Il s'agit de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* et *M. hapla*, qui ont une large gamme d'hôtes (Sikora & Fernandez, 2005). Parmi plus de 1000 populations de nématodes à galles collectées dans 75 pays, 53% de ces populations ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *M. incognita*, 30% à l'espèce *M. javanica*, 8% à *M. arenaria*, 7% à l'espèce *M. hapla* et 2% à *M. exigua* ou d'autres espèces peu représentées.

M. incognita et *M. javanica* se retrouvent souvent dans les régions tropicales (**Figure 4**), tandis que *M. arenaria*, qui est également présent sporadiquement dans les régions tropicales, est plus fréquente dans les régions subtropicales. *M. hapla* est une espèce commune des régions tempérées, qui est retrouvée aussi dans les hautes-terres froides des régions tropicales (Sikora & Fernandez, 2005).

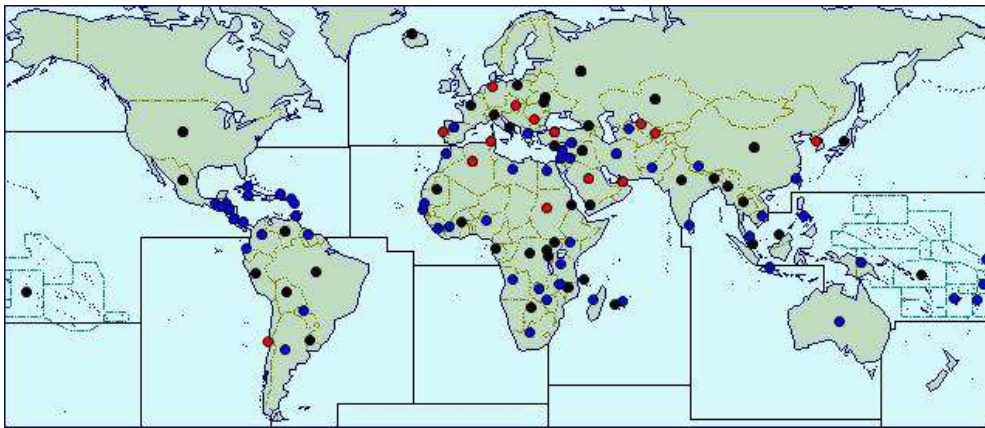


Figure 4. Carte de la distribution planétaire de *M. javanica*. Points noirs : présents, non détaillé ; Points bleus : très répandus ; Points rouges : présents localement.

(www.cabi.org/isc/?compid=5&dsid=33246&loadmodule=datasheet&page=481&site=144)

1.1.5. Modes de la reproduction

Il existe des modes différents de la reproduction chez les nématodes à galles, incluant l'amphimixie, la sexualité facultative, l'automixie et l'apomixie. Certaines espèces du genre *Meloidogyne* se reproduisent par l'amphimixie obligatoire, telles que *M. carolinensis*, *M. megatyla*, et *M. microtyla* (Triantaphyllou, 1985; Chitwood & Perry 2010). Par contre, *M. incognita*, *M. javanica* et *M. arenaria* se reproduisent par parthogénèse mitotique (apomixie) uniquement (Triantaphyllou, 1966 ; Perry & Moens, 2011). Chez *M. hapla*, il existe des souches qui diffèrent de mode de reproduction ; la souche A peut se reproduire soit par amphimixie soit par la parthogénèse meiotique (automixie), alors que l'apomixie est obligatoire chez la souche B (Triantaphyllou, 1966 ; Sasser & Carter, 1985 ; Perry & Moens, 2011).

1.1.6. Cycle de vie

Les espèces de genre *Meloidogyne spp.*, sont des endoparasites sédentaires. Les larves J1 se développent dans les œufs. Les juvéniles de deuxième stade (J2) éclosent des œufs, puis ils migrent vers les racines et y pénètrent soit par l'apex, soit par des zones de pénétration antérieures, soit par des petites lésions sur des racines (Dirk & Romulo, 1998). Les juvéniles envahissent le cylindre central, où ils établissent des sites nourriciers permanents dans la zone de différenciation de la racine en induisant des divisions nucléaires (karyocinèse) découplées de la cytokinèse dans les cellules hôtes du cylindre central. Ce procédé engendre des cellules multinucléées appelées les cellules géantes. Chaque juvénile de nématode peut déclencher le développement de 5 à 7 cellules géantes, chacune de ces cellules peut contenir plus que 100 noyaux lobés. Les cellules de parenchyme entourant les cellules géantes subissent une hyperplasie et hypertrophie, qui conduisent à la formation des galles sur les racines (Wiggers *et al.*, 1990). (**Figure 5**). La formation de ces cellules géantes qui constituent les sites nourriciers perturbe ou bloque les vaisseaux du

xylème. Les juvéniles J2 se nourrissent de ces cellules géantes et muent trois fois avant de parvenir au stade de femelles adultes qui se développent rapidement. A maturité, les femelles sont sacciformes (**Figure 2**). Elles pondent des œufs dans une matrice gélatineuse formant une masse d'œufs (**Figure 6**). Une seule masse d'œufs peut contenir plusieurs centaines d'œufs (Sharon & Spiege, 1993 ; Dirk & Romulo, 1998).

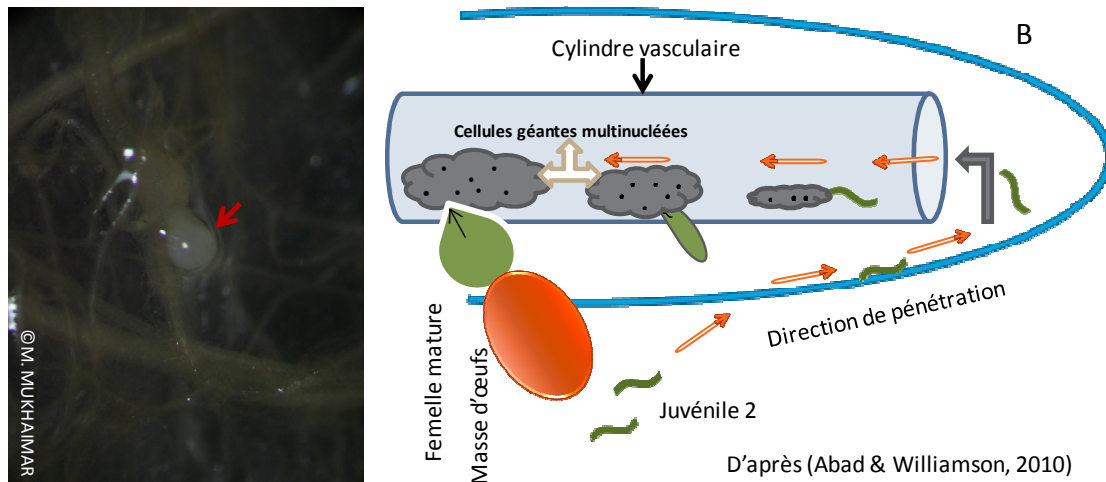


Figure 5. Cycle de vie de nématodes à galles et leur voie de pénétration dans les racines. A. Une femelle mature dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* (flèche rouge). **B.** Représentation schématique de la voie de pénétration de nématodes à galles *Meloidogyne* spp. dans la racine.

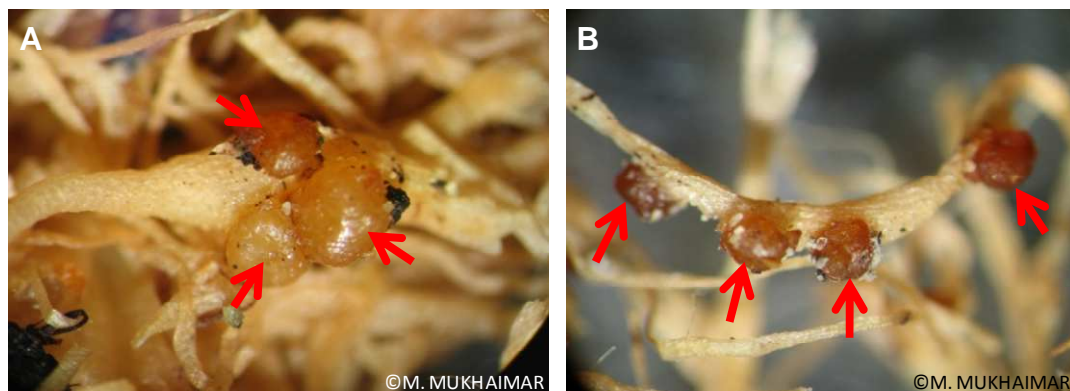


Figure 6. Masses d'œufs de *M. javanica* sur les racines de tomates. A. plusieurs masses d'œufs sont attachées à une seule galle; **B.** une seule masse d'œufs est attachée à une seule galle.

1.1.7. L'éclosion

L'éclosion des œufs de *Meloidogyne spp.* se produit lorsque la température est favorable, et se fait chez la plupart des espèces sans d'avoir besoin de stimulation par des substances diffusées par les racines. Cependant, chez *M. hapla*, *M. triticoryzae* and *M. chitwoodi* l'éclosion est aussi dépendante des diffusats racinaires (Gaur *et al.*, 2000; Perry & Wesemael, 2008). Le processus d'éclosion chez les nématodes peut être divisé en trois phases, (i) un changement dans la perméabilité de coquilles d'œuf, (ii) une activation métabolique du juvénile et (iii) l'éclosion proprement dite. L'ordre chronologique de première et deuxième phases diffère selon les genres, et chez *Meloidogyne spp.*, il semble que l'activation de juvénile se produit d'abord et cause des changements au niveau des coquilles d'œuf (Perry, 2002).

1.1.8. Attraction des nématodes et la pénétration

Il est évident que les nématodes utilisent leur sensilles chimio-sensorielles, appelées amphides, pour s'orienter vers les racines en utilisant au moins l'un des gradients cités ci-dessous. Il existe autour des racines en pleine croissance plusieurs gradients de composés volatiles et non volatiles (Weischer, 1959 ; Prot, 1975), d'acides aminés, d'ions minéraux (Dropkin *et al.*, 1958 ; Ibrahim & Hollis, 1967 ; Evans, 1969), de pH (Jairjapuri & Azmi, 1978), de la température (Wallace, 1961 ; El-sherif & Mai, 1969 ; Rode 1969 ; 1970) et de CO₂ (Johnson & Viglierchio, 1961 ; Edmunds & Mai, 1967 ; Croll & Viglierchio, 1969 ; Klingler, 1972). Il est difficile à savoir exactement quel(s) facteur(s) est/sont responsable(s) pour l'attractivité des racines car les informations disponibles sont habituellement basées sur des essais de comportement *in vitro* qui sont souvent fondés sur l'utilisation des plaques d'agar. Il faut, donc, être prudent d'extrapoler vers la situation sur le terrain à partir de ces études (Spence *et al.* 2009 ; revue par Perry & Moens, 2011).

Les parois cellulaires racinaires se dégradent sous l'effet des enzymes qui sont sécrétées par les glandes subventrales des nématodes. Ces enzymes passent par le stylet pour faciliter la migration du nématode en affaiblissant ou en brisant les parois cellulaires. Parmi les enzymes identifiées, on trouve la cellulase (β -1,4-endoglucanase ; EC : 3.2.1.4 ; Smant *et al.*, 1998 ; Yan *et al.*, 1998 ; Rosso *et al.*, 1999 ; Goellner *et al.*, 2000), la pectate lyase (EC 4.2.2.2 ; Popeijus *et al.*, 2000), la xylanase (EC 3.2.1.8 ; Mitreva-Dautova *et al.*, 2006), et la polygalacturonase (EC 3.2.1.15 ; Jaubert *et al.*, 2002) (revue par Davis *et al.* 2000; Gheysen & Jones 2006 ; **Tableau 2**). Une autre enzyme identifiée dans les sécrètes esophageales est le chorismate mutase (EC 5.4.99.5), impliqué dans le voie de synthèse du shikimate (Lambert *et al.*, 1999 ; Doyle & Lambert, 2003 ; Vanholme *et al.*, 2009). Des agents phytopathogènes comme des bactéries et des champignons produisent également des enzymes similaires. Ces enzymes n'étant pas produites chez les nématodes non parasites ou chez des autres invertébrés, il est probable que les nématodes phytoparasites ont acquis ces fonctions par un transfert horizontal de gènes d'origine bactérienne ou

fongique (Yan *et al.*, 1998 ; Popeijus *et al.*, 2000 ; Veronico *et al.*, 2001 ; Jaubert *et al.*, 2002 ; Bird *et al.*, 2003 ; Abad *et al.*, 2008 ; revue par Perry & Moens, 2011).

Tableau 2. Certains produits de gènes sécrétés des glandes œsophagiennes de deux espèces des nématodes à galles. ¹*M. incognita*; ²*M. javanica*. D'après Williamson & Gleason (2003).

produit de gène	Fonction possible	Organismes avec des homologues étroits
¹ beta-1,4-endoglucanase (cellulase)	Dégradation de la paroi cellulaire.	Bactérie
² Pectate lyase	Dégradation de la paroi cellulaire.	Bactérie et champignons
¹ Polygalacturonase	Dégradation de la paroi cellulaire.	Bactérie
² Chorismate mutase	Changer l'équilibre de l'auxine. Formation des cellules alimentaires.	Bactérie

Après la pénétration, les juvéniles se déplacent et intercellulairement dans le parenchyme cortical en direction de l'apex racinaire qui est le site préféré d'invasion par les nématodes à galles. Ils utilisent leur stylet pour migrer intercellulairement en séparant les cellules sous l'effet des sécrétions enzymatiques et en utilisant probablement aussi de la force mécanique (Huang, 1985 ; Sijmons *et al.*, 1991). Après l'arrivée au méristème apical racinaire, les juvéniles font demi-tour et pénètrent ainsi par la zone méristématique dans le cylindre central en ayant contourné l'endoderme (**Figure 5**).

Si le chemin de migration des juvéniles J2 vers l'extrémité de la racine est bien établie, les facteurs qui participent à l'orientation des juvéniles restent pour le moment inconnus. Certains auteurs suggèrent que ces facteurs peuvent être de nature électrique, chimique ou thermique (Stewart *et al.*, 1993 ; Perry & Maule, 2004).

1.1.9. Modifications de l'expression des gènes de plantes en réponse à l'infection de nématodes

L'infection d'une plante par des nématodes phytoparasites entraîne des changements de l'expression des gènes de la plante. Certaines indications suggèrent que les nématodes suppriment activement les réactions de défense de l'hôte, probablement par une ou plusieurs substances injectées (mais le mécanisme n'est pas encore connu) par le stylet des nématodes (Qin *et al.*, 1994 ; Sijmons *et al.*, 1994 ; Puthoff *et al.*, 2003 ; revue par Gheysen & Fenoll, 2002 ; Smart & Jones, 2011). De même, l'établissement des sites nourriciers par les nématodes et le développement des cellules géantes, induits par les nématodes à galles, ou des syncytiums, induits par les nématodes à kyste, entraînent des modifications de la paroi cellulaire, indiqués par une augmentation de l'expression des gènes codant pour l'endoglucanase et la polygalacturonase de l'hôte après infection par des nématodes à galles (Mahalingam *et al.*, 1999 ; Goellner *et*

al., 2000 ; 2001). En outre, l'expression d'un gène homologue de pectine acétylsterase des plantes est augmentée dans les cellules géantes d'*Arabidopsis*, mais pas dans des cellules géantes matures, suggérant que cette enzyme joue probablement un rôle dans la formation des sites nourriciers (Vercauteren *et al.*, 2002). De même, l'infection par des nématodes phytoparasites entraîne des changements au niveau du métabolisme des cellules de la plante, de la progression du cycle cellulaire et le transport de l'eau dans et autour des cellules géantes (Jones & Dropkin, 1976 ; Hussey & Grundler, 1998 ; Potenza *et al.*, 2001 ; revue par Gheysen & Fenoll, 2002), souvent accompagné par des changements au niveau des facteurs de transcription. Par exemple, les orthologues de *PHAN* et *KNOX*, qui sont des régulateurs de la transcription et qui interviennent dans la formation et le maintien des méristèmes des plantes, sont actives dans les sites nourriciers de nématodes à galles (Koltai *et al.*, 2001).

Les changements de l'expression de gènes ont été ciblés par un grand nombre d'études. Le nombre de gènes détectés varie fortement entre ces différentes études, selon l'interaction étudiée, les conditions de l'expérience et les techniques utilisés pour la détection des gènes exprimés différemment. Alors que les techniques de la fusion du promoteur avec un gène rapporteur ou d'hybridations *in situ* (Goddijn *et al.*, 1993 ; Niebel *et al.*, 1996 ; Barthels *et al.*, 1997 ; Favery *et al.*, 1998 ; Goverse *et al.*, 1998 ; Puzio *et al.*, 2000 ; Goellner *et al.*, 2001 ; Escobar *et al.*, 2003 ; Lohar *et al.*, 2004) se sont focalisés sur le rôle des gènes candidats individuels, et que les stratégies de criblage de bibliothèques d'ADNc différentielles (Gurr *et al.*, 1991 ; Bird & Wilson, 1994), de 'Differential Display' (Hermsmeider *et al.*, 1998 ; 2000 ; Vercauteren *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2003a) ou de piège de promoteur (Barthels *et al.*, 1997 ; Favery *et al.*, 1998 ; 2002) ont identifiés plusieurs dizaines de gènes des plantes impliqués dans l'interaction plante-nématodes phytoparasites, l'utilisation des puces d'ADN (Puthoff *et al.*, 2003 ; Bar-Or *et al.*, 2005 ; Hammes *et al.*, 2005 ; Jammes *et al.*, 2005 ; Fuller *et al.*, 2007 ; Schaff *et al.*, 2007 ; Barcala *et al.*, 2010) a permis de découvrir de plusieurs centaines, voire milliers des gènes des plantes qui changent leur expression pendant l'infection avec des nématodes phytoparasites.

Parmi les 22089 gènes détectés à l'aide de puce d'*Arabidopsis* CATMA, Jammes *et al.* (2005) ont identifié 3373 gènes qui affichent une différence significative d'expression entre des galles, provoqué par *M. incognita*, en différents stades de développement et des tissus non-méristématiques des racines non infectés. Les nombres de gènes d'*Arabidopsis* surexprimés (1606) ou réprimés (1742) dans les galles étaient similaires; en plus, 25 gènes étaient d'abord régulés dans un sens et après dans l'autre. Parfois, l'expression des gènes était surexprimée jusqu'à 15 fois, incluant les gènes codant pour pectate lyase (At4g24780), β -expansin EXPB3 (At4g28250) et pyruvate decarboxylase-1 (At4g33070). Cependant, le réprimé le plus fort était observé pour des gènes codant pour une protéine inconnue exprimée (At3g21520) et deux gènes liés à la défense des plantes qui sont codés pour la patatine (At2g26560) et la protéine germin-like (At4g14630).

En utilisant la microdissection au laser, Barcala *et al.* (2010) ont réussi à séparer les cellules géantes des tissus voisines, permettant l'analyse de changements de l'expression de gènes des cellules géantes induits par des nématodes, et la comparaison transcriptomique entre les cellules géantes et les galles. 3 jours post infection par *M. javanica*, 1161 gènes étaient exprimés différemment pendant les phases initiales de la formation des cellules géantes. La majorité de ces gènes, 851, était régulée vers le bas, y compris une grande partie des gènes impliqués dans les réactions de défense des plantes et le métabolisme secondaire. De même, un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme primaire, la synthèse d'ARN et des protéines était régulé vers le bas. Par contre, des gènes impliqués dans la biosynthèse d'ARN, la maintenance et le remodelage de la structure de chromatine et codantes pour des composants du cytosquelette étaient surexprimés.

L'analyse des changements de l'expression de gènes montrait une image différente pour les galles. Le nombre de gènes régulés différemment était moins important ; seule 547 gènes étaient influencés, et la plupart des gènes, 354, était régulée vers le haut (Barcala *et al.*, 2010). Seule 100 gènes ont été identifiés d'être régulés en commun entre cellules géantes et galles, dont 54 reprimés et 66 surexprimés. D'un côté, la différence des résultats entre cellules géantes et galles pourrait être expliquée par un effet de dilution, parce que les cellules géantes ne représentent qu'une petite partie de la galle. De l'autre côté, ces résultats reflètent au moins partiellement des véritables différences de régulation des gènes entre les cellules géantes et les cellules voisines, montrant la complexité des processus pendant l'interaction entre nématodes et plante. Ci-dessus, trois exemples illustrent la complexité de ces processus.

Favery *et al.* (1998), ont réussi à isolé un gène chez *Arabidopsis* (*RPE*) essentiel pour les étapes précoces de la formation des sites nourriciers induits par les nématodes à galles *M. incognita*. Ce gène code pour une protéine similaire à la D-ribulose-5-phosphate3-épimérase (EC 5.1.3.1), une enzyme clé dans l'étape réductrice du cycle de Calvin et dans la voie des pentoses phosphates (le segment oxydatif irréversible). En plus, ils ont montré l'accumulation des transcrits de ce gène, *RPE*, dans les sites nourriciers induits par *M. incognita*. Ce gène est exprimé aussi dans les sites d'initiation des racines latérales chez *Arabidopsis* suggérant que le contrôle génétique des premières phases de la formation des méristèmes et des cellules géantes partage des étapes communes (Favery *et al.*, 1998; Mazarei *et al.*, 2003).

Dans le but d'identifier des gènes impliqués dans la formation des cellules géantes en réponse à l'infection par *M. incognita*, Caillaud *et al.* (2008) ont utilisé une analyse fonctionnelle de promoteurs génomiques de lignées d'*Arabidopsis* mutées par un ADN-T associé au gène rapporteur *GUS*. Ils ont ainsi réussi à mettre en évidence le rôle crucial joué par le gène *AtMAP65-3* lors de l'infection. Ce gène qui code pour une protéine associée aux microtubules de la famille *MAP65*, est exprimé aux stades précoces de la formation du site nourricier induit par le nématode. En l'absence d'une *AtMAP65-3* fonctionnelle, les cellules nourricières se développent, mais ne parviennent pas à se différencier totalement et sont finalement détruites, ce qui aboutit à un développement incomplet du nématode à galles et à sa mort. La

régulation négative du gène *AtMAP65-3* diminue la sensibilité de la plante *Arabidopsis* transgénique aux nématodes à galles. Alors, *AtMAP65-3* est un gène de sensibilité de l'hôte, jouant un rôle critique dans l'interaction plante-nématode par son implication dans l'ontogenèse des cellules géantes (Caillaud *et al.*, 2008).

Dans les cellules nourricières des galles et les syncytiums on trouve des cycles supplémentaires de réplication avec synthèse massive de l'ADN dans les galles et les syncytiums (Rubinstein & Owens, 1964; Rohde & McClure, 1975; de Almeida Engler *et al.*, 1999). L'endocycle est une variante du cycle cellulaire chez les eucaryotes, composé uniquement de phases de réplication (S) et de phases Gap (probablement un part de G1, et G2) aboutissant à la formation des cellules multinucléées, sans division cellulaire (De Veylder *et al.*, 2011). Dans les cellules nourricières induites par *Meloidogyne incognita* et dans les syncytiums induits par *Heterodera schachtii*, trois des gènes de cycle cellulaire, *CCS52A1*, *CCS52B* et *DEL1*, sont impliqués dans le contrôle de l'endocycle (Cebolla *et al.*, 1999 ; Vlieghe *et al.*, 2005). *CCS52A* et *CCS52B* sont des protéines clés du cycle cellulaire qui se comportent comme des protéines adaptateurs importantes pour l'activation de la promotion de l'anaphase complexe et sont impliqués dans la conversion de cycles mitotiques en endocycles (de Almeida Engler *et al.*, 2012). Cependant, *DEL1* est un inhibiteur qui supprime la transcription de gènes nécessaires pour entrer dans l'endocycle (Vlieghe *et al.*, 2005; Lammens *et al.*, 2008 ; de Almeida Engler *et al.*, 2012). La perturbation de la modification induite par les nématodes de ces trois gènes impactait fortement le développement et la morphologie des cellules géantes et des syncytiums, au détriment des nématodes (de Almeida Engler *et al.*, 2012).

1.1.10. Symptômes causés par les nématodes à galles

Les symptômes observés sur les parties aériennes des plantes attaquées sont (i) le flétrissement, (ii) nanisme, (iii) la diminution de la taille des feuilles et (iv) le jaunissement des feuilles. Sur les racines, le symptôme le plus évident est la formation de galles (**Figure 7**). D'une manière générale, l'infection par des nématodes engendre une baisse des rendements ou une déformation des tubercules, des fruits, et des bulbes (De Waele & David, 1998).

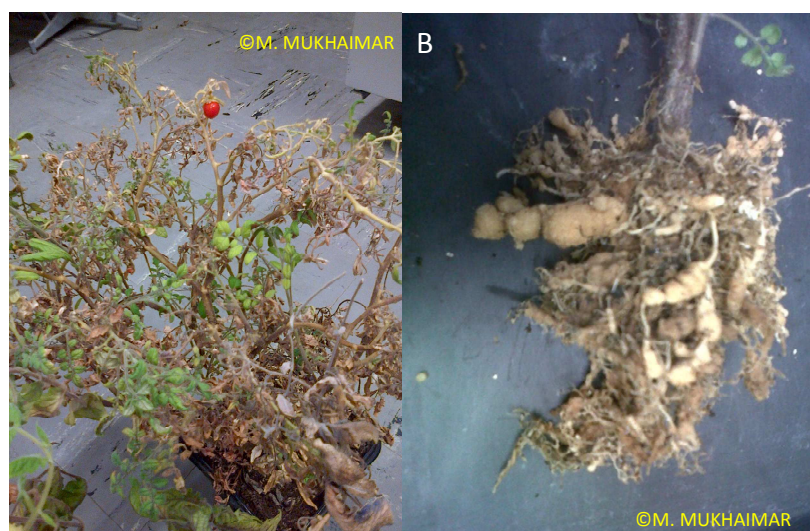


Figure 7. Symptômes causées par les nématodes à galles *Meloidogyne javanica*. A. Sur les parties aériennes de tomates. **B.** Sur les racines de tomate, plus de 4 mois après l’infection.

1.1.11. Impact économique de nématodes à galles

Les nématodes phytoparasites causent de dégâts économiquement importants, estimés à plus de 100 milliards de dollars par an (Bélaïr, 2005). Les nématodes à galles *Meloidogyne spp.* sont responsables d’environ 5% des pertes globales de rendements causées par l’ensemble des agents phytopathogènes, ravageurs et bio-agresseurs (Sasser & Carter, 1985). Les pertes varient par espèce de nématode et de plante, et entre les régions géographiques considérées. Le **Tableau 3** donne une estimation des pertes occasionnées aux cultures par les nématodes en fonction de ces paramètres.

Tableau 3. Estimation des pertes de rendements causées par les nématodes à galles (¹Bridge *et al.*, 2005 ; ²McDonald & Nicol, 2005 ; ³Sikora & Fernandez, 2005).

Espèce de nématode	Plante hôte	Région	Perte estimée
<i>M. incognita</i> ¹	Colocase	Inde	21%
<i>M. incognita</i> ¹	Rizière	Altitudes	60%
<i>M. naasi</i> ²	Céréales	Californie-USA	75%
<i>M. artiellia</i> ²	Blé	Italie	90%
<i>Meloidogyne spp.</i> ³	Aubergine	Tropicale	17-20%
	Melon	Tropicale	18-33%
	Tomate	Tropicale	24-38%
	Pomme de terre	Tropicale	> 25%
	Patate douce	Tropicale et méditerranéenne	> 25%

1.1.12. Gestion de nématodes phytoparasites

Il y a plusieurs méthodes pour lutter contre les nématodes phytoparasites. Selon la nature de la méthode employée, elles peuvent être regroupées en cinq catégories principales : (i) les pratiques culturales ; (ii) les méthodes physiques ; (iii) la lutte biologique ; (iv) la lutte chimique ; et (v) la lutte génétique.

1.2.12.1. Les pratiques culturales

La rotation culturale est l'une des méthodes les plus anciennes et les plus importantes pour la gestion des ravageurs. La rotation avec des cultures résistantes ou non-hôtes pour deux à trois ans permet généralement un excellent contrôle des nématodes à galles pour les maintenir sous le seuil de dommage (Johnson, 1982). Cependant, Il est important d'éliminer des mauvaises herbes ou d'autres espèces qui peuvent servir comme réservoir des nématodes concernés. Par exemple, la rotation avec le maïs peut réduire les populations de *Meloidogyne hapla* (Johnson, 1982 ; Raymundo, 1985), et la rotation des cultures incluant le radis, le blé, le maïs, l'oignon et la tomate résistante peut être efficace contre les populations de *M. javanica* mais limitée car les nématodes à galles sont des polyphages (Kanwar & Bhatti, 1993).

Les champs nus, sans plantes adventices, et labouré et exposé au soleil, privent les nématodes de leur alimentation, et sont, donc, un bon moyen de réduire la population des nématodes. L'irrigation pendant les périodes sèche peut aussi aider à réduire les populations de nématodes, sous réserve que les mauvaises herbes soient contrôlées efficacement (Overman, 1964; Rhoades, 1982; Johnson & Fassuliotis, 1984). L'incorporation de matières végétales décomposées dans le sol en grande quantité peut diminuer les populations de nématodes à galles. Ces matières organiques décomposées stimulent les populations de champignons, de bactéries et d'autres micro-organismes existant dans le sol qui sont des antagonistes aux nématodes (Badra *et al.*, 1979 ; Muller & Gooch, 1982 ; Rhoades & Forbes, 1986 ; Rodriguez-Kabana & Morgan-Jones, 1987).

1.2.12.2. Les méthodes physiques

La solarisation est un processus hydrothermal qui consiste à couvrir pendant un mois et demi le sol, saturé d'eau en été, par un plastique fin transparent, afin d'élever la température du sol, qui peut atteindre 50-55 °C à 5 cm de profondeur, et 40-42 °C à 20-25 cm de profondeur. Ce processus désinfecte le sol des nématodes et des autres phytopathogènes (Guet, 1999). Cependant, cette solarisation change la microflore, qui peut engendrer des effets négatifs. Une autre méthode thermique pour désinfecter le sol est la vaporisation. Elle consiste à introduire de la vapeur d'eau dans le sol sous les bâches en plastique pour augmenter la température à un niveau létal pour les organismes nuisibles vivants dans le sol (Braga *et al.*, 2001).

1.2.12.3. La lutte biologique

La lutte biologique contre les nématodes phytoparasites emploie des organismes vivants antagonistes aux nématodes comme des champignons ou des bactéries (Stirling, 1991 ; Davies & Spiegel, 2011). Des différents types des champignons utilisés en lutte contre les nématodes phytoparasites ont été décrits telles que : Les champignons prédateurs comme *Arthrobotrys irregularis*, un hyphomycète qui est capable de piéger rapidement les juvéniles de nématodes à galles (Cayrol, 1981). Les champignons ovicides comme *Paecilomyces lilacinus* (Jatala *et al.*, 1979 ; Cayrol *et al.*, 1992 ; Kiewnick & Sikora 2006) ou *Verticillium chlamydosporium*, qui attaquent les embryons dans les œufs de nématodes (Godoy *et al.*, 1983a ; Kerry *et al.*, 1984 ; Rodriguez-Kabana *et al.*, 1984 ; Kerry & Deleu, 1991 ; de Leijet *al.*, 1993). Les nématophages à spores adhésives (revué par Cayrol *et al.*, 1992) incluent les oomycètes *Catenaria anguillulae*, *Myzocyttium lenticulare* et *M. anomalum* qui forment des zoospores biflagellées, capables de se diriger vers les nématodes et de se fixer sur leur cuticule en s'y enkystant ; le zygomycète *Meristacrum asterospermum* qui produit des conidies sphériques, ces dernières se collent sur le corps du nématode et se développent dans le nématode; le deuteromycète *Meriaconiospora* qui se développe en façon semblable à la précédente espèce; le basidiomycète *Nematoctonus leiosporus*, qui possède des spores adhésives en forme de bâtonnets se fixant sur la cuticule du nématode. Malgré leur grande ubiquité et leur polyphagie, ces organismes sont difficiles à cultiver sur des milieux synthétiques ; alors, leur utilisation en tant qu'agents de lutte biologique reste limitée. Cependant, les hypomycètes du genre *Hirsutella*, qui peuvent parasiter plusieurs espèces des nématodes phytoparasites se cultivent facilement sur plusieurs milieux synthétiques (Sturhan & Schneider, 1980 ; Jaffee & Zehr, 1982).

Ils existent aussi des bactéries antagonistes des nématodes, par exemple, *Pasteuria spp.*, un bactérie à endospores. *Pasteuria spp.* sont des agents pathogènes de plusieurs genres des nématodes phytoparasites (Brown *et al.*, 1985 ; Sayre & Starr, 1985 ; Stirling, 1985; Sturhan, 1988 ; Bird & Brisbane, 1988; Gowen & Ahmed, 1990 ; Gowen & Tzortzakakis, 1994; Tzortzakakis & Gowen, 1994). Des populations différentes de la bactérie semblent être hautement spécifique, non seulement pour certains genres de nématodes (Starr & Sayre, 1988), mais aussi pour des populations de la même espèce (Spaull, 1984 ; Stirling, 1985 ; Davies *et al.*, 1988 ; Channer & Gowen, 1992). Le cycle de vie de *Pasteuria penetrans* est parfaitement synchrone de celui de ses hôtes ; après adhésion, dans le sol, de ses spores libres sur la cuticule des nématodes, un tube germinatif entre dans la cavité générale de l'hôte où il se ramifie et finit par sporuler au détriment de la reproduction du nématode, qui ne produit plus d'œufs et meurt. Les nouvelles spores sont alors répandues dans le sol pour le cycle parasitaire suivant (Sayre & Starr, 1988 ; revue par Fould *et al.*, 2000).

Des nombreuses plantes, par exemple les tagetes, le ricin, la perdrix, le pois, les asperges et le sésame, possèdent des propriétés nématocides. Les tagetes sont les plantes le plus étudiées pour leur propriétés nématocides (McSorley, 1999 ; Ploeg, 1999 ; 2002). Ces plantes peuvent être cultivées en

différentes façons pour protéger les cultures sensibles aux nématodes phytoparasites, en culture intercalaire ou en rotation en tant qu'autre culture. Ces plantes peuvent aussi être utilisées comme un engrais vert qui va être enfoui avant la culture sensible. De même, l'extraits de ces plantes peuvent être appliqués dans le sol ou en traitant les plantules par ces extraits (revue par Duval, 1993).

1.2.12.4. La lutte chimique

Plusieurs nématicides chimiques sont utilisés pour lutter contre les nématodes phytoparasites, incluant des fumigants (1,3-dichloropropène, chloropicrin, dazomet, éthylène dibromide, métham-sodium, méthyl bromide, méthyl isothiocyanate) et de non-fumigants tels que des organophosphates (Ebufos, Ethoprophos, Fenamiphos, Fensulfothion, Isazofos, Terbufos, Thionazin) et des carbamates (Aldicarb, Aldoxycarb, Carbofuran, Cleothocarb, Oxamyl) (<http://www.fao.org/docrep/V9978E/v9978e08.htm>). En générale, les fumigants, et notamment le nétham-sodium et le 1,3-dichloropropène, sont plus efficaces contre les nématodes phytoparasites que les non-fumigants (Hague & Gowen, 1987 ; Noling & Becker, 1994), mais ils sont aussi plus nocifs sur l'environnement (Hutchinson *et al.*, 1999). La majorité de nématodes phytoparasites passent leurs vies confinées dans le sol ou dans les racines de plantes, et la livraison d'un produit chimique directement à la rhizosphère de plantes est difficile. La surface extérieure de nématodes est biochimiquement une faible cible et imperméable à de nombreuses molécules organiques. La livraison d'un composé toxique par une voie orale est presque impossible, car la plupart des nématodes phytoparasites ingèrent les molécules des nématicides seulement lors de l'alimentation sur les racines des plantes. Les nématicides efficaces sont généralement très toxiques à un large spectre d'espèces et leur utilisation présente un risque élevé pour la santé humaine et de l'environnement (Chitwood, 2003). Par conséquent, de nombreux nématicides ont été interdits dans l'UE, les Etats-Unis et d'autre pays.

Plusieurs produits naturels ont été testés comme des alternatives potentielles des pesticides chimiques, incluent, par exemple, la chitine ou des extraits des algues. La décomposition de la chitine libère dans le sol de l'azote ammoniacal dans le sol qui probablement contribue à la réduction des populations de nématodes d'une façon directe (Mian *et al.*, 1982), ou par la stimulation des activités lytiques des bactéries ou des champignons dans le sol (Godoy *et al.*, 1983b ; Rodriguez-Kabana *et al.*, 1987). Plusieurs recherches ont montré l'effet de la chitine sur la réduction des population de *Meloidogyne incognita* (de Jin *et al.*, 2005), *Heterodera trifolii*, *Tylenchus spp.*, et *Pratylenchus spp.* (Sarathchandra *et al.*, 1996). De même, les extraits de certains algues ont la capacité de réduire le nombre de nématodes phytoparasites dans le sol (Wu *et al.*, 1998 ; Radwan *et al.*, 2012).

1.1.12.5. La lutte génétique

Finalement, l'un des moyens le plus important de lutte contre les nématodes phytoparasites est l'utilisation de plantes cultivées résistantes. L'origine des résistances contre des nématodes phytoparasites sont très souvent des plantes sauvages apparentées, et les résistances ont été introgressées dans des

plantes cultivées. La résistance peut s'appuyer sur un seul gène majeur ou sur plusieurs ou multiple gènes à caractère quantitatif. Les chapitres suivants se focalisent sur la cartographie des gènes et des QTL de résistance chez les plantes cultivées.

Actuellement, un défi majeur pour l'agriculture de l'avenir est de trouver des outils efficaces pour lutter contre les nématodes phytoparasites, en particulier en vue d'un certain nombre de changements majeurs récents tels que : (i) l'interdiction totale du bromure de méthyle, le fumigant le plus efficace (Watson *et al.*, 1992 ; US Environmental Protection Agency, 1993 ; Noling & Becker, 1994) ; (ii) le manque de nématicides non-fumigènes efficaces (Mojtahedi *et al.*, 1991 ; Stirling *et al.*, 1992) ; (iii) le développement des souches virulentes des nématodes vis-à-vis du gène commune de résistance (Riggs & Winstead, 1959 ; Roberts, 1982; Cook & Evans, 1987 ; Omwega *et al.*, 1990 ; Mullin *et al.*, 1991 ; Roberts, 1992 ; Young, 1992 ; Opperman *et al.*, 1994) ; (iv) le raccourcissement de la rotation des cultures pour des raisons de commercialisation (McKenry, 1987 ; Barker, 1991; Rodriguez-Kabana, 1992) ; (v) l'expansion de la culture protégée à la fois sous serre/tunnels et dans des systèmes de culture hydroponiques ; (vi) la détection des nouvelles espèces économiquement importantes des nématodes à galles telles que *Meloidogyne chitwoodi*, *M. mayaguensis* et *M. floridensis* (Rammah & Hirschmann, 1988 ; Handoo *et al.*, 2004) ; (vii) l'expansion de l'aire de répartition des espèces importantes de ces phytoparasites (Bridge, 1987; Sikora, 1988 ; revue par Sikora *et al.*, 2005). Donc, la recherche des nouveaux gènes ou QTL de résistances devient de plus en plus importante.

1.1.13. Cartographie de gènes et QTL de résistance

Chez les plantes cultivées la cartographie de QTL est une méthode qui est très souvent utilisée pour identifier des régions génomiques contenant des gènes de résistance contre les nématodes phytoparasites. Par exemples, cette approche a été utilisée pour la cartographie de QTL conférant la résistance contre : (i) les nématodes à kyste du soja, *Heterodera glycines* (Webb *et al.*, 1995 ; Meksem *et al.*, 2001 ; Concibido *et al.*, 2004 ; Guo *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2009 ; Arelli *et al.*, 2010 ; Chang *et al.*, 2011 ; Arriagada *et al.*, 2012) ; (ii) les nématodes à kyste des céréales, *Heterodera avenae* chez le blé (Williams *et al.*, 2006) ; (iii) les nématodes à kyste de la pomme de terre, *Globodera pallida* (Kreike *et al.*, 1994 ; Rouppe van der Voort *et al.*, 1998 ; Bryan *et al.*, 2002) ; (iv) plusieurs espèces de nématodes des lésions des racines, *Pratylenchus* chez le blé (Schmidt *et al.*, 2005; Zwart *et al.*, 2005; 2006; 2010; Toktay *et al.*, 2006; Jayatilake *et al.*, 2013; Linsell *et al.*, 2014) et chez l'orge (Sharma *et al.*, 2011 ; Galal *et al.*, 2014). Egalement, la cartographie de QTL a été conduite pour identifier des loci contribuant à la résistance contre les nématodes à galles, (v) chez le coton (Shen *et al.*, 2006 ; 2010 ; Wang *et al.*, 2012a ; He *et al.*, 2014) ; (vi) chez le soja (Tamulonis *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2001 ; Ha *et al.*, 2007 ; Fourie *et al.*, 2008 ; Shearin *et al.*, 2009 ; Xu *et al.*,

2013) ; (vii) chez le riz (Shrestha et al., 2007 ; Mamta et al., 2013) ; (viii) chez la patate douce (Cervantes-Flores et al., 2008), et (ix) chez la pomme de terre (Brown et al., 1996 ; Kouassi et al., 2006). Récemment, une cartographie de QTL a aussi été conduite pour identifier des QTL de la résistance contre l'anguillule des feuilles de riz, *Aphelenchoides besseyi* (Zhou et al., 2014).

En plus, des autres gènes de résistance contre les nématodes phytoparasites avaient été cartographiés par liaison ; ces gènes étaient des gènes dominants à effets majeurs. Ici, on passe en revue des exemples pour ces gènes majeurs tel que : les gènes *Hs* (Heller et al., 1996 ; Sandal et al., 1997) et le gène *R6m-1* (Weiland & Yu, 2003) chez la betterave ; les gènes *Mi* chez la tomate (Ammati et al., 1985 ; Klein-Lankhorst et al., 1991 ; Messeguer et al., 1991 ; Yaghoobi et al., 1995 ; Veremis & Roberts 1996a ; 1996b ; 1996c ; 2000 ; Veremis et al., 1999 ; Ammiraju et al., 2003) ; les gènes *Me* chez le piment (Dijan-Caporalino et al., 2001 ; 2007) ; le gène *H1* (Gebhardt et al., 1993 ; Pineda et al., 1993) et le gène *GroV1* (Jacobs et al., 1996) chez la pomme de terre ; les gènes *Mae* et *Mag* chez l'arachide (Garcia et al., 1996) ; le locus *Mj-1* chez la carotte (Boiteux et al., 2000) ; les gènes *Mi* et *Mij* chez le pêcher (Lu et al., 1999 ; 2000 ; Yamamoto & Hayashi, 2002) et le gène *Ma* chez le prunier (Esmenjaud et al., 1996 ; Lecouls et al., 1999 ; 2004 ; Claverie et al., 2004).

1.1.14. Gènes de résistance et mécanismes de défense

Cependant, le nombre de gènes clonés conférant une résistance contre certaines espèces de nématodes phyto-endoparasites sédentaires reste très limité. Ces gènes incluent *Hs1^{pro-1}* (Cai et al., 1997), *Mi-1* (Milligan et al., 1998 ; Vos et al., 1998), *Gpa2* (van der Vossen et al., 2000), *Hero A* (Ernst et al., 2002 ; Sobczak et al., 2005), *Gro1-4* (Paal et al., 2004) *CaMi* (Chen et al., 2007), *Ma* (Claverie et al., 2011), *Rhg1* (Cook et al., 2012) et *Rhg4* (Liu et al., 2012).

L'origine de gène *Hs1^{pro-1}*, qui confère une résistance contre le nématode à kyste *Heterodera schachtii*, est la betterave sauvage (*Beta procumbens*). Ce gène a été introduit dans la betterave cultivée (*Beta vulgaris*) par le croisement entre les deux espèces, sauvage et cultivée, suivi de rétro-croisements (Savitsky, 1978 ; Jung & Wricke, 1987 ; Heijbroek et al., 1988). Le gène *Mi-1*, qui confère une résistance contre plusieurs espèces des nématodes à galles, dont les espèces *M. javanica*, *M. incognita* et *M. arenaria* (Gilbert & McGuire, 1955 ; Braham & Sasser, 1956 ; Thomason & Smith, 1957), a été trouvé chez la tomate sauvage *Solanum peruvianum*, et introduit chez les tomates cultivées (*Solanum esculentum*) dans les années 1940 (Smith, 1944). Le gène *Gpa2* confère la résistance contre plusieurs souches de *Globodera pallida* chez la pomme de terre à *Solanum tuberosum* (Roupe van der Voort et al., 1997). Ce gène a été trouvé chez la pomme de terre sauvage *S. tuberosum ssp. andigena* (Roupe van der Voort et al., 1999). Le gène *Hero A*, provenant de la tomate sauvage *Solanum pimpinellifolium* (Ellis & Maxon-Smith, 1971) protège la tomate cultivée contre plusieurs souches des nématodes à kyste *G. rostochiensis* et *G. pallida*.

(Ganal *et al.*, 1995). Un autre gène de résistance contre *G. rostochiensis* est *Gro1-4*, qui a été introduit dans la pomme de terre cultivée. L'origine du gène *Gro1-4* est la pomme de terre sauvage *Solanum spegazzinii* (Ross, 1986 ; Barone *et al.*, 1990). Le gène *CaMi*, qui a été cloné d'une accession résistante de *Capsicum annuum* (Chen *et al.*, 2007), confère une résistance contre le nématode à galles *M. incognita*. Le gène *Ma* confère une résistance contre plus de 30 espèces des nématodes à galles (Esmenjaud *et al.*, 1994), dont *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. mayaguensis* (Claverie *et al.*, 2011) et *M. floridensis* (Handoo *et al.*, 2004), et vient du prunier *Prunus cerasifera* (Claverie *et al.*, 2011).

Rhg1 et *Rhg4* sont des QTL de résistance du soja, *Glycine max*, contre le nématode à kyste *Heterodera glycines* (Concibido *et al.*, 2004). Le locus *Rhg1* contient plusieurs gènes, encodant un transporteur d'acides amino, une protéine alpha-SNAP, et une protéine contenant un domaine 'inductible par blessure', dans un fragment du génome de 31-kb (Cook *et al.*, 2012). La résistance conférée par ce locus dépend du nombre des répétitions de ce fragment ; les variétés du soja sensibles aux nématodes *H. glycine* portent une seule copie de ce fragment par génome haploïde, alors que les variétés résistantes portent 10 copies en tandem (Cook *et al.*, 2012). *Rhg4* code pour une serine hydroxyméthyltransférase (Liu *et al.*, 2012). Le mécanisme de résistance n'est pas encore connu ; on suppose que la variété résistante porte des mutations qui soit dérèglent la production d'acide folique, soit produisent un métabolite toxique pour les nématodes (Liu *et al.*, 2012).

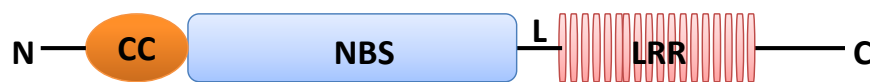


Figure 8. Les protéines R du type CC-NBS-LRR. La figure montre les domaines : **CC**, Coiled Coil ; **LRR**, la région 'leucine rich repeat', avec 20 à 29 résidus riches en leucine ; **NBS**, La région 'nucleotide binding site'. **N**, amino-terminus. **L**, liaison. **C**, carboxyle terminus. D'après McHale *et al.* (2006).

Tous les autres gènes de résistance clonés, à l'exception du gène *Hs1^{pro-1}*, sont des gènes *R* typiques (**Figure 8**), contenant des domaines 'coiled coil', 'nucleotide binding site' et 'leucine rich repeat' (CC-NBS-LRR) tels que les gènes : *CaMi*, *Gpa2*, *Hero A*, *Mi-1* ; ou 'toll interleucine receptor', 'nucleotide binding site' et 'leucine rich repeat' (TIR-NBS-LRR) tels que les gènes *Gro1-4*, *Ma*. Les gènes *R* sont très souvent impliqués dans la défense de plantes contre des agents pathogènes (revue par Hammond-Kosack & Jones, 1997 ; Ellis *et al.*, 2000 ; McHale *et al.*, 2006 ; Hammond-Kosack & Kanyuka, 2007). Les protéines *R* perçoivent la présence des molécules effectrices secrétées par un agent pathogène. Cette perception des molécules effectrices active un réseau de signaux par phosphorylation, oligomérisation, dégradation ou changements conformationnels des protéines *R*, et par mouvement des protéines *R* entre cytoplasme et noyaux. Le résultat de la traduction du signal est une réponse de défense coordonnée de plante, locale et

systémique, incluant, par exemple, la production des espèces réactives de l'oxygène ou la réponse hypersensible, qui est caractérisé par la mort rapide de cellules au point d'infection (**Figure 9**). Par exemple, le gène *Mi-1* qui confère la résistance contre certaines espèces de nématodes à galles. Chez les tomates résistantes, les nématodes pénètrent les racines et migrent vers le site nourricier. Cependant, aucune cellule géante n'est induite. Une nécrose localisée, suggérant une réponse hypersensible, est visible près de l'extrémité antérieure du nématode après quelques jours de l'infection (Dropkin, 1969 ; Paulson & Webster, 1972). Le moment et le lieu de la réponse indiquent que la pénétration de la cellule par le stylet de nématode et l'injection des sécrétions, qui sont destinés à initier le développement des cellules nourriciers, suscitent la réponse (Brueske, 1980 ; Zacheo *et al.*, 1993).

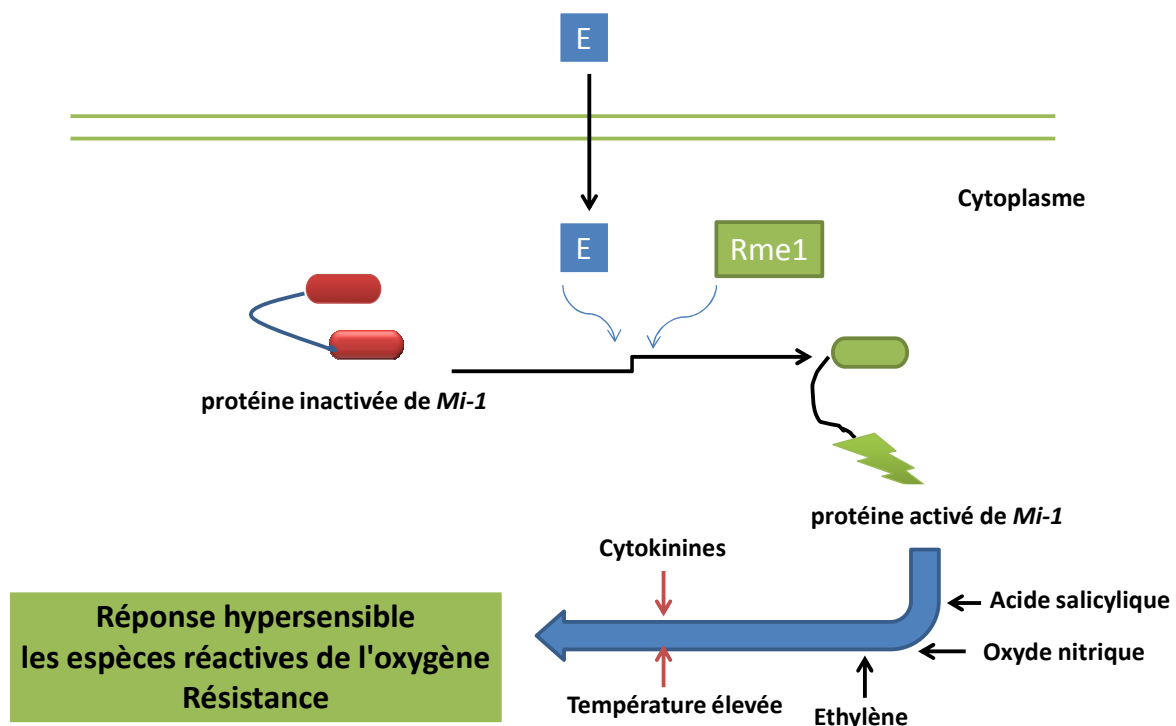


Figure 9. Modèle générale de rôle de la protéine Mi-1. La présence d'une molécule effectrice (E) de nématode dans le cytoplasme d'une cellule de plante est perçue par **Mi-1**, résultant en une activation de cette protéine. Des protéines supplémentaires tels que **Rme1** peuvent être impliquées dans cette interaction, qui initie la signalisation moléculaire, conduisant à une réponse de défense. Les petites flèches indiquent les agents qui activent (**en noir**) ou inhibent (**en rouge**) la voie de signalisation (d'après Williamson & Robert, 2009).

1.2. *Arabidopsis thaliana*

1.2.1. Caractéristiques

1.2.1.1. Botanique

Arabidopsis thaliana est une plante annuelle originaire d'Europe, d'Asie et du nord-ouest de l'Afrique, appartenant à la famille des Brassicacées. Les études les plus récentes reconnaissent neuf espèces distinctes dans le genre d'*Arabidopsis* : *A. thaliana* ($2n = 10$) ; *A. arenosa* ($2n = 16$) ; *A. neglecta* ($2n = 16$ ou 32) ; *A. croatica* ; *A. lyrata* ($2n = 16$ ou 32) ; *A. halleri* ($2n = 16$) ; *A. suecica* ($2n = 26$, cette dernière issue d'un croisement entre *A. thaliana* ($2n = 10$) et *A. arenosa* ($2n = 16$) ; *A. cebennensis* et *A. pedemontana* (Al-Shehbas & O'Kane, 2002).

C'est une plante de petite taille (20-25 cm de hauteur), ses feuilles, qui forment une rosette basale, sont vertes ou légèrement violacées et couvertes de petits poils unicellulaires, appelés trichomes. Ses fleurs blanches sont disposées en corymbe, et forment des siliques contenant en moyenne cinquante graines. Le cycle complet d'*A. thaliana* est d'environ 6 semaines, la tige centrale qui produit des fleurs et siliques se développe après environ trois semaines. C'est une espèce très majoritairement autogame, mais qu'on peut facilement croiser pour produire des hybrides (Bouchez, 2004).

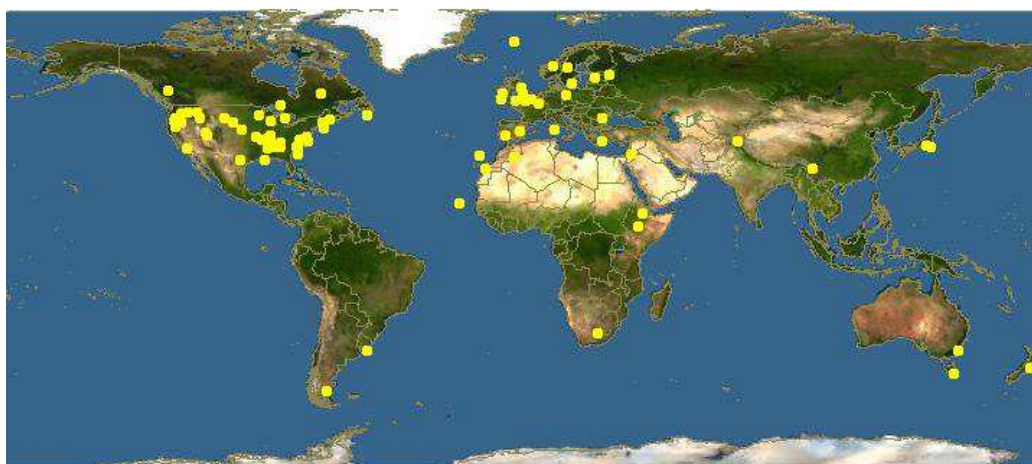


Figure 10. Carte de la distribution géographique d'*Arabidopsis thaliana*.

(<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Arabidopsis+thaliana&guide=Wildflowers>)

1.2.1.2. Distribution géographique

L'aire de répartition naturelle de cette plante va de la Scandinavie au nord jusqu'à l'Afrique du Nord et le Moyen-Orient au sud. *A. thaliana* occupe le plus souvent des habitats ouverts ou perturbés tels que les berges, bords de route, terrains vagues, vieux murs, terres cultivées, pentes rocheuses, sur des sols sableux et/ou caillouteux, le plus souvent nus ou avec un faible couvert (Bouchez, 2004). En vue de la distribution géographique d'*A. thaliana* qui inclut des régions différentes (Figure 10), il est possible de

trouver une large gamme des variations naturelles chez cette plante modèle, ces variations traduisent l'adaptation aux différentes conditions environnementales (Alonso-Blanco & Koornneef, 2000).

1.2.1.3. Développement

A. thaliana est une espèce herbacée annuelle typique, son cycle de vie simple, et comprend quatre stades de développement:

- Plantule : après germination, élongation et ouverture des cotylédons, les premières feuilles apparaissent.
- Rosette : formation d'une rosette de feuilles. Le nombre de feuilles formées est extrêmement variable en fonction des génotypes et des conditions de milieu, allant de 5-6 jusqu'à plusieurs centaines.
- Floraison : apparition et élongation d'une tige principale au centre de la rosette et ouverture des premières fleurs. Des hampes florales secondaires peuvent se développer à partir de la base, parfois en grand nombre. La production de graines est en conséquence très variable.
- Fructification et sénescence : sénescence des feuilles, maturation et déhiscence des fruits. Les graines, très petites, peuvent germer immédiatement ou après une période de dormance plus ou moins longue en fonction des génotypes (Bouchez, 2004).

1.2.1.4. Génétique

Le génome d'*A. thaliana* est relativement petit, avec environ 125 mégabases (Mbp), organisé en cinq paires de chromosomes ($2n = 10$) (Bouchez, 2004). Depuis 2000, la totalité du génome d'*A. thaliana* est séquencé; ce qui facilite l'identification des gènes et la caractérisation de leur structure, leur fonction et leur régulation. Le génome contient environ 25000 gènes (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

En bref, *A. thaliana* cumule beaucoup de caractéristiques qui font d'elle une espèce modèle pour la recherche, ces caractéristiques incluent: une petite taille (on peut planter une dizaine de milliers de plantes dans un espace limité), cycle de vie rapide, génome simple et séquencé, grand nombre de ressources pour la recherche (millions de lignées mutées, grande collection des accessions venant des régions géographiques et écologiques différentes, et toutes accessibles dans des centres de stockage publique), des populations pour la cartographie, des marqueurs génétiques, des séquences pour un grand nombre des accessions, et un très grand nombre de publications scientifiques.

1.2.2. La variation naturelle : Les accessions d'*Arabidopsis*

Une accession est un échantillon d'une espèce pris dans une localisation spécifique. Vu la grande aire de répartition d'*A. thaliana* des accessions venant des zones géographiques et climatiques différentes, possédant des variantes génétiques adaptées localement à leurs aire d'origine, sont disponibles. En comparant des accessions différentes, cultivées dans des mêmes conditions, on révèle de la variation génétique naturelle pour de nombreux caractères.

La variation génétique pour la résistance contre les bio-agresseurs tels que des bactéries, des champignons, des virus, des insectes et des nématodes a été trouvée. Cette évaluation est devenue facile à effectuer grâce à la grande collection des accessions différentes venant du monde entier (Koornneef *et al.*, 2004).

1.2.3. La variation phénotypique

La variation phénotypique présente toute différence entre individus qui peut être, par exemple, morphologique ou physiologique. Ces différences sont provoquées par des différences génétiques, environnementales et l'interaction génétique - environnement. La variation phénotypique peut être divisée en deux catégories selon la nature de la variation : la variation discontinue, ou qualitative, et la variation continue, ou quantitative. Certains caractères varient d'une façon méristique, ayant des morphes discrets et distincts comme, par exemple, les caractères de couleur et forme des petits pois décrits par Mendel. La résistance induite par des gènes dominants de type *R* est un autre exemple de la variation discontinue, ou qualitative. D'autres caractères présentent une variation continue, avec une gamme ininterrompue de phénotypes. La taille d'un organisme est un bon exemple de ce type de variation. Généralement, les phénotypes intermédiaires sont plus courants que les phénotypes extrêmes. Un grand nombre de caractères d'intérêt tels que le rendement, la précocité de floraison (Loudet *et al.*, 2002 ; El-Lithy *et al.*, 2006), la résistance contre les ravageurs (Kroymann *et al.*, 2003 ; Pfalz *et al.*, 2007 ; 2009) et contre les phytopathogènes necrotroph (Kim & Diers 2000 ; Kliebenstein *et al.*, 2002 ; Micic *et al.*, 2004 ; Llorente *et al.*, 2005 ; Finkers *et al.*, 2007 ; 2008 ; Maxwell *et al.*, 2007) sont quantitatifs, c'est-à-dire que leur variation est continue.

En générale, les caractères qualitatifs sont contrôlés par peu de gènes aux effets majeurs. Les caractères quantitatifs sont contrôlés par des gènes nombreux, certains parmi eux avec des petits effets additifs et/ou épistatiques, certains avec des effets plus importants, appelés des locus de caractères quantitatifs.

1.2.4. Locus de caractères quantitatifs - QTL

On admet que plusieurs secteurs chromosomiques, portant un ou plusieurs gènes dont de nombreux allèles sont responsables de la variabilité, sont impliqués dans le contrôle des caractères dits quantitatifs. Ces locus sont appelés QTL : Quantitative Trait Locus (en anglais) ou locus de caractères quantitatifs (Loudet *et al.*, 2002 ; El-Lithy *et al.*, 2006). La cartographie des QTL responsables de la variation de ces caractères permet de disséquer leur architecture génétique (Loudet & Daniel-Vedele, 2004).

Pour identifier des QTL il faut :

- Un ensemble de plantes issues d'un croisement entre deux parents, qui varient pour le caractère étudié. Chez *Arabidopsis*, puisque la plupart des accessions sont largement homozygotes, la génération d'une population des lignées recombinantes autofécondées (en anglais 'recombinant inbred lines', RILs) est très simple. Cependant, il existe d'autres schémas de croisement plus complexes pour la création d'une population utilisée en cartographie de QTL, tels que les lignées 'Multi-parent Advanced Generation Inter-Cross' (MAGIC) (Kover *et al.*, 2009 ; Huang *et al.*, 2012) ; ou l'induction de l'haploïdie (Seymour *et al.*, 2012).
- Des marqueurs génétiques qui permettent d'identifier du quel parent vient chaque partie de chaque chromosome tout au long du génome.
- Le phénotype de chaque individu de la population pour le caractère d'intérêt.
- Des méthodes statistiques pour associer, pour chaque individu, la valeur du caractère étudié et son génotype pour chaque partie de chaque chromosome. Cette analyse permet de calculer le nombre et la position des différents QTL qui influencent l'état du caractère, ainsi que leurs contributions respectives à la variation de caractère et la contribution des interactions génétiques entre ces locus. Généralement, les effets additifs et épistatiques peuvent être estimés ; mais aussi selon le type de population utilisée pour la cartographie, on peut aussi estimer des effets de la dominance (Loudet *et al.*, 2002 ; El-Lithy *et al.*, 2006).

1.2.5. Populations de cartographie

Pour construire une carte génétique il faut une population caractérisée par (i) la ségrégation: la population doit être dérivée d'une reproduction sexuelle ; et par (ii) la variation: Les parents sélectionnés pour cette population doivent être différents au caractère étudié, par exemple la résistance contre les nématodes à galles dans notre cas. Il faut des grands effectifs. La plupart des recherches de QTL qui emploient des populations de RILs d'*Arabidopsis* utilisent entre 50 - 250 lignées (Koornneef *et al.*, 2004). Certaines méthodes de la cartographie telle que l'étude d'association pangénomique (en anglais 'genome wide association mapping'), nécessite un plus grand nombre d'individus. Le degré de la résolution de la

cartographie est lié à la taille de la population employée, plus elle est importante, plus fine est la résolution.

Des différents types de populations peuvent être utilisés pour la cartographie d'une espèce végétale donnée : (i) la population de F2; (ii) la population de croisement reversé (en anglais : 'backcross', BC) ; (iii) la population DH ('doubled haploid') ; (iv) l'induction de l'haploïdie ; et (v) la population des lignées recombinantes autofécondées (en anglais : 'recombinant inbred lines', RILs).

La population F2 est dérivée d'un individu hybride F1 d'un croisement, et la population BC est dérivée du croisement entre un individu hybride F1 avec un des parents. Tous les deux (F2 et BC) sont les faciles à engendrer pour la cartographie des caractères quantitatifs des espèces autofécondées, et ils permettent à estimer la dominance, en plus de l'additivité et l'épistasie (Collard *et al.*, 2005). Par contre, elles ont des désavantages, au niveau de chaque locus marqueur, en moyenne, 50% des individus des deux types de croisements sont hétérozygotes. Pour les marqueurs dominants, les homozygotes ne peuvent pas être distinguées des hétérozygotes, donc, la précision de la cartographie est réduite. En plus, les générations suivantes ségrégent encore de la variation génétique, donc c'est impossible de maintenir l'identité génétique des lignés (Xu, 2010).

Régénérer des plantes par l'induction du doublement chromosomique des graines de pollens, la génération d'une population DH n'est pas possible sauf chez des espèces qui se prêtent à la culture *in vitro* telles que le riz, l'orge et le blé. L'avantage le plus important de ce type de population est la production des lignées homozygotes qui peuvent être multipliées et reproduites sans aucun changement survenant génétiquement (Collard *et al.*, 2005).

Récemment, Ravi & Chan (2010) ont développé une nouvelle méthode rapide pour la création des lignées haploïdes doublées, basé sur une mutation nulle de *cenh3-1*. CENH3 est l'histone qui est spécifique pour les centromères. Le mutant peut être complété par un transgène CENH3-GFP. Quand les plantes mutées, porteuses des allèles nuls pour cette histone, sont croisées avec des plantes non-mutées, les chromosomes des mutants sont éliminés, aboutissant à la génération des plantes haploïdes à haute fréquence. Certaines des plantes haploïdes doublent leur génome spontanément, et le génome peut aussi être doublé par un traitement avec colchicine. Cette méthode de la génération des plantes haploïdes était utilisée pour engendrer une population de cartographie d'*Arabidopsis* (Seymour *et al.*, 2012), en croisant d'abord deux accessions sauvage d'*Arabidopsis* entre eux. Après, la F1 issue de ce croisement était croisé avec l'inducteur de l'haploïdie (**Figure 11**). Cette méthode engendre une population de cartographie perpétuelle, car les plantes résultantes sont recombinées et homozygotes ; son avantage en comparaison avec les populations de lignées recombinées RIL est sa vitesse. En utilisant l'inducteur de l'haploïdie, seulement trois générations de plantes sont nécessaires pour arriver à une population de plantes 100% homozygotes.

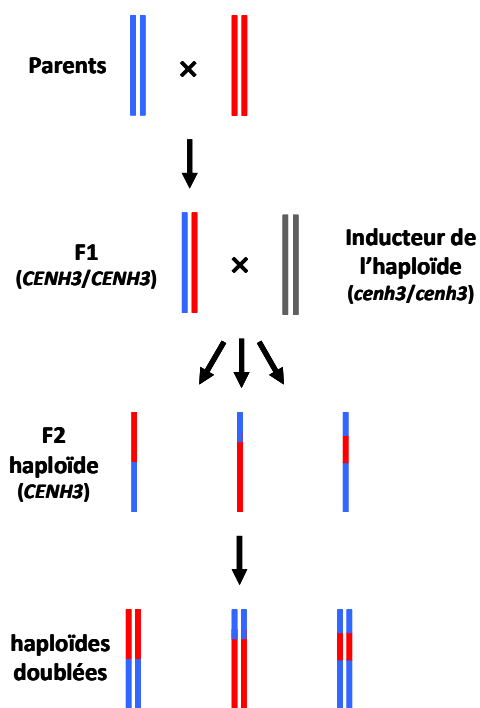


Figure 11 : L'inducteur de l'haploïdie. Après avoir croisé deux accessions sauvages d'*Arabidopsis* (chacune est représentée par 2 chromosomes en rouge et bleu), les plantes F1 issues de ce croisement, qui sont hétérozygotes, sont croisées avec l'inducteur de l'haploïdie (représenté par 2 chromosomes en gris). Dans le zygote fertilisé, les chromosomes de parent mutant (l'inducteur) sont supprimés à une fréquence élevée, résultant en une fraction substantielle des plantes haploïdes dans la F2 qui portent uniquement des chromosomes venant des deux accessions sauvages (les parents initiaux). Par le jeu de méiose, les plantes F2 ont des recombinaisons différentes. Puis, les plantes haploïdes se transformeront aux plantes diploïdes, soit spontanément, soit en utilisant de la colchicine.

Les populations de lignées recombinantes (RIL) sont construites à partir d'un croisement entre deux accessions (qui diffèrent pour le caractère étudié), on obtient des plantes F1 génétiquement identiques et complètement hétérozygotes. L'autofécondation de ces plantes donne des graines F2, qui sont toutes différentes par le jeu des recombinaisons à la méiose, et qui forment la base de la population. La population de lignée recombinante est obtenue par des autofécondations successives de plusieurs individus F2. A chaque génération suivante, un individu par lignée s'autoféconde pour engendrer la génération suivante. Le taux d'hétérozygotie se diminue de moitié chaque génération. Dans la génération F6 le taux d'hétérozygotie reste à seulement d'environ 3%. Ainsi, après plusieurs autofécondations, tous les individus d'une lignée seront génétiquement identiques, (**Figure 12**). Ces populations sont à terme constituées d'un grand nombre de lignées recombinantes différentes, dont le génome est constitué de la juxtaposition de fragments de chromosomes issus de chacun des parents. En conclusion, chaque lignée de cette population contient une combinaison unique et fixe des fragments chromosomiques des parents originaux. Cette caractéristique de la population RIL nous permet à faire le génotypage une seule fois et avoir des répliquations et des analyses phénotypiques multiples de la même population. De plus, plusieurs populations RIL sont disponibles aux centres de stockage d'*A. thaliana*. Le désavantage de ce type de population que c'est un travail de longue haleine pour rendre homozygote et donc invariable la population (Loudet & Daniel-Vedele, 2004).

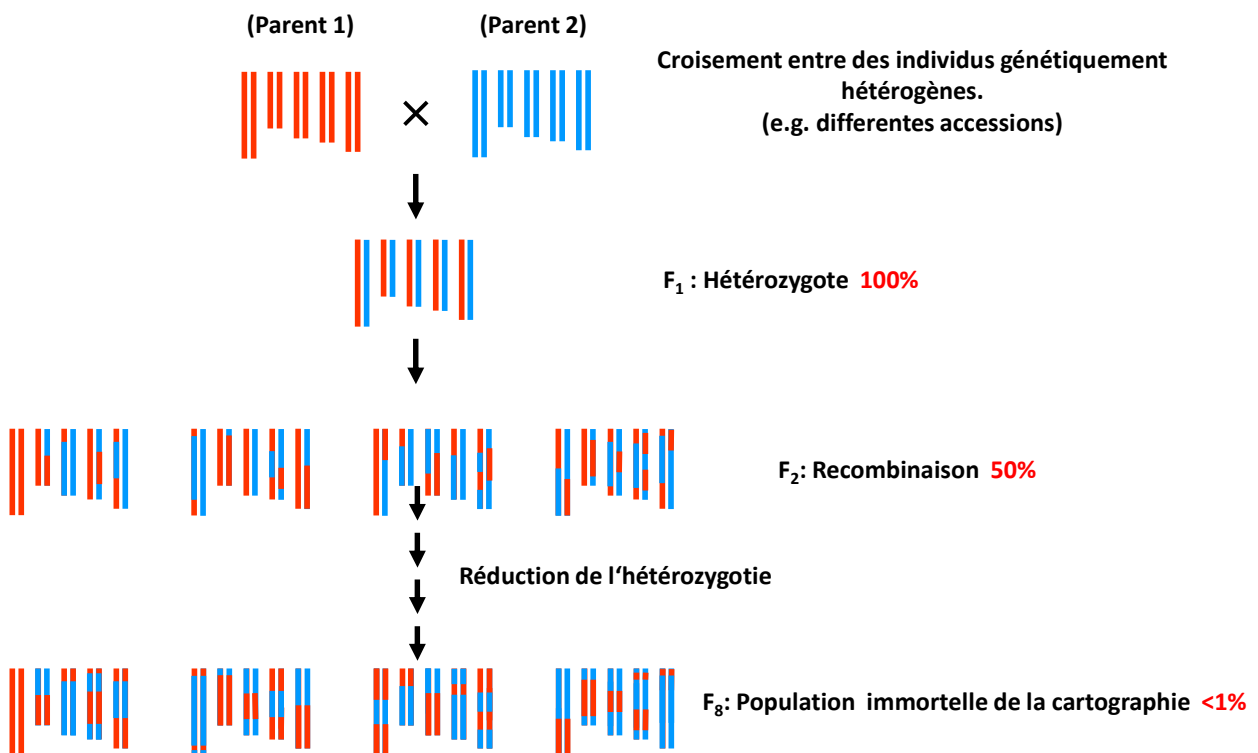


Figure 12. Population RIL issue d'un croisement entre deux accessions différentes d'Arabidopsis. Le croisement entre deux lignées parentales homozygotes (en bleu et rouge) engendre des plantes de la génération F1 qui sont hétérozygotes. Les plantes des générations suivantes sont obtenues par autofécondation. Les génomes parentaux recombinent à la méiose. Le taux d'hétérozygotie diminue de moitié chaque génération, et il reste que 1% d'hétérozygotie à la F8. D'après J. Kroymann (communication personnelle).

1.3. Les objectifs de la thèse

Arabidopsis thaliana a été reconnu comme un outil de recherche sur les interactions plantes-nématodes depuis l'année 1991. Sijmons *et al.* (1991) ont montré que plusieurs espèces de nématodes phytoparasites peuvent achever un cycle de vie complet dans les racines d'*A. thaliana*. Ensuite, *Arabidopsis* est devenue un modèle pour la biologie cellulaire et moléculaire de l'interaction plante-nématodes. Ensuite, un grand nombre de gènes de plante qui modifie leur niveau de l'expression en réponse aux nématodes a été identifié, suggérant que ces gènes peuvent jouer un rôle dans la mise en place de l'interaction plante-nématode (*e.g.*, Puthoff *et al.*, 2003 ; Jammes *et al.*, 2005 ; Caillaud *et al.*, 2008 ; Barcala *et al.*, 2010). En effet, le génie génétique de certains de ces gènes de plante conduit à l'augmentation de la résistance contre les nématodes (Caillaud *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2011 ; Hewezi *et al.*, 2012).

De même, *Arabidopsis* a été utilisée pour la cartographie et aussi le clonage d'un multitude de QTL (revue par Alonso-Blanco & Koornneef, 2000 ; Koornneef *et al.*, 2004 ; Shindo *et al.*, 2007 ; Alonso-Blanco *et al.*, 2009), incluent les QTL contrôlant les interactions plant-ennemie (*e.g.*, Jander *et al.*, 2001 ; Lambrix *et al.*, 2001 ; Kroymann *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2006 ; Pfalz *et al.*, 2007 ; 2009).

L'existence d'une variation génétique naturelle d'*Arabidopsis* contre les nématodes phytoparasites a été reconnu (Sijmons *et al.*, 1991 ; Boiteux *et al.*, 1999). La cartographie de QTL de gènes de résistance contre les nématodes phytoparasites est établie chez des espèces cultivées (voir **1.1.13.**), mais aucune étude n'avait été publiée exploitant la variation génétique naturelle chez *Arabidopsis* pour identifier des gènes associés à cette résistance par une approche de cartographie de QTL.

Est-ce que c'est possible d'utiliser *Arabidopsis* pour la cartographie de QTL de résistance contre les nématodes à galles ? Quelles sont les conditions expérimentales à employer ? Quelle est l'architecture génétique de la résistance contre les nématodes à galles chez *Arabidopsis* ? Quels sont les gènes qui contrôlent la variation de résistance contre les nématodes à galles chez *Arabidopsis* ? Quelle est leur fonction ?

Pour commencer à répondre à ces questions, ma thèse a pour objectifs :

- L'optimisation des conditions expérimentales pour les analyses quantitatives de la résistance contre les nématodes à galles chez *Arabidopsis*.
- L'analyse de la variation naturelle de la résistance chez différentes accessions d'*A. thaliana* contre les nématodes à galles (*Meloidogyne javanica*), ce qui vise à déterminer la population structurée d'*Arabidopsis* la plus appropriée pour une cartographie de QTL.
- La cartographie de QTL en populations sélectionnée afin d'identifier des QTL de résistance contre *M. javanica*.
- La cartographie fine d'un ou deux QTL pour identifier des gènes candidats impliqués dans la défense contre *M. javanica*.

Le nématode à galles *Meloidogyne javanica* a été choisi comme modèle de phytoparasite dans ces études. Wu *et al.* (1998) ont montré que *M. javanica* peut achever son cycle de vie sur *Arabidopsis*. *M. javanica* est l'une des trois espèces de nématodes à galles le plus répandues dans le bassin méditerranéen et dans les régions tropicales. Surtout, *M. javanica* n'est pas un organisme de quarantaine, cette espèce est déjà présente en France (voir **Figure 4**). Donc, l'utilisation de cette espèce dans des expériences n'exige pas des procédures spécifiques pendant la manipulation, à l'exception des précautions pour éviter la contamination de l'environnement avec des agents phytopathologiques. Une population de *M. javanica* nous a été aimablement fournie par Dr. T. Mateille (CBGP : Centre de Biologie pour la Gestion des Populations, Montferrier-sur-Lez, France).

2. Matériels et Méthodes

2.1. Culture d'Arabidopsis

La surface de graines d'Arabidopsis est stérilisée sous une hotte à flux laminaire, en utilisant une solution mixte qui contient 90% (v/v) de l'éthanol (95% (v/v)) et 10% (v/v) de l'hypochlorite de sodium (10% (w/v)) dans de l'eau. Les graines sont déposées dans des tubes de 2 ml, et une quantité de 2 ml de la solution mixte est ajouté dans chaque tube pendant 15-20 minutes. Ensuite, la solution mixte est jetée et les graines sont rincées deux fois avec l'éthanol (95% (v/v)). A l'aide d'une petite quantité de l'éthanol 95% (v/v), les graines sont versées sur des papiers filtre stérilisés et placés dans de petites boîtes de Pétri pour sécher.

Sous la hotte à flux laminaire les graines sont semées dans des boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif (½ Murashige & Skoog incluant la vitamine B5 Gamborg). 400 ml du milieu contiennent 0,86 g M&S (Duchefa Biochimie, Pays-Bas), 4 g sucrose (Duchefa Biochimie, Pays-Bas), 4 g agar de plante (Duchefa Biochimie, Pays-Bas), 0,39 g MES (Carl ROTH, Inc., Allemagne), ajusté à pH 5,7. La préparation de ce milieu a été décrite par Estelle & Somerville (1987). Ensuite, les boîtes de Pétri avec les graines d'Arabidopsis sont déposés dans la chambre froide (6 °C) pendant trois jours à l'obscurité.

Les boîtes sont transférées dans la chambre de culture climatisée avec les conditions contrôlées suivantes: conditions de jour : 11,5 h à 22,5 °C et 60% d'humidité relative; conditions de nuit : 12,5 h à 16 °C et 70% d'humidité relative. Pendant les premiers trois ou quatre jours, les boîtes de pétri sont déposées en position horizontale pour assurer le maximum de la lumière. Ensuite, les boîtes sont orientées semi verticale pour éviter la pénétration de racines au milieu nutritif. 12 - 15 jours après le transfert des boîtes de pétri à la chambre de culture, les plantules sont transférées aux pots (7x7x7 cm) contenant du sable stérile (sable 02, sac à 35 kg – SACAMAT ; société Petruzzella, Bures-sur-Yvette, France).



Figure 13. Culture d'*A. thaliana*. A gauche, sur des plateaux. A droite, sur des soucoupes en plastiques.

Les pots sont placés collectivement, à plusieurs pots sur des plateaux, ou individuellement, sur des soucoupes en plastique (**Figure 13**). Dans le cas de l'utilisation des plateaux, le même nombre des répliquats

pour chaque génotype d'*Arabidopsis* est mis sur le même plateau. La distribution des réplicats sur le plateau est aléatoire. La position des plateaux dans la chambre de culture et la position de pots sur les plateaux est changée chaque jour afin de compenser des petites fluctuations de conditions dans la chambre de culture. De même, dans le cas de l'utilisation des soucoupes, les plantes sont randomisées dans l'espace de la chambre de culture et leurs positions sont changées chaque jour.

Afin de compenser la pauvreté en éléments nutritifs dans le sol sableux, les plantes sont fertilisées avec l'engrais chimique HydrokaniTMC2 (Hydro Agri France ; solution-mère à diluer d'éléments majeurs, secondaire et oligo-éléments). L'ajout de l'engrais chimique et la concentration utilisée est en fonction de l'âge de plante, compté à partir du transfert des plantules aux pots (**Tableau 4**).

Les pots sont régulièrement arrosés avec de l'eau afin de maintenir le sable humide. En générale, chaque pot est arrosé avec une quantité de 25 - 30 ml de l'eau tous les 4 - 5 jours. Cette période se varie selon l'âge de plantes. Il faut noter que l'eau est rajouté en dessous des pots et non pas directement sur les plantes.

Tableau 4. Le calendrier de l'ajout de l'engrais chimique « HydrokaniTM » en fonction de l'âge de plante.

Âge de plante	Quantité de l'eau	Concentration de l'Hydrokani TM
0 jours	25 ml	0.1% (v/v)
7 jours	25 ml	0.1% (v/v)
15 jours	30 ml	0.1% (v/v)
25 jours	30 ml	0.1% (v/v)
32 jours	30 ml	0.15% (v/v)
39 jours	30 ml	0.15% (v/v)
46 jours	30 ml	0.15% (v/v)
52 jours	30 ml	0.15% (v/v)

2.2. Source permanente de *Meloidogyne javanica*

Des masses d'oeufs de nématodes à galles *Meloidogyne javanica*, nous a été aimablement fournie par Dr. T. Mateille (CBGP : Centre de Biologie pour la Gestion des Populations, Montferrier-sur-Lez, France).

La population de nématodes est maintenue sur de tomates de la variété Roma qui est sensible aux nématodes phytoparasites. Quelques graines de tomates sont semées dans un petit pot contenant du terreau. Les tomates sont cultivées dans une armoire de culture climatisée (Pol-EkoAparatura- type kk 1200 STD ; Wodzisław Śląski-Pologne) avec les conditions contrôlées suivantes : conditions de jour : 14 h à 28° C et 65% d'humidité relative; conditions de nuit : 10 h à 19 °C et 65% d'humidité relative. Après l'apparition de la deuxième feuille véritable, les plantules sont transférées aux pots de taille moyenne contenant un

mélange du sable et du terreau dans une proportion de 2 : 1, préalablement stérilisé pendant 3 heures à 120 °C. Après un mois de transfert des plantules environ 85 - 100 juvéniles de nématodes sont distribués dans trois trous d'une profondeur de 2 - 3 cm autour de la tige. Tous les 3 - 4 mois, des nouvelles plantes de tomates sont inoculées par des nématodes provenant des plantes de tomates déjà infectées.

2.3. Préparation de l'inoculum

Un mois après l'inoculation des tomates par les nématodes, des galles sont typiquement bien formées sur les racines. Les racines de tomates sont lavées soigneusement en utilisant un seau rempli avec de l'eau du robinet pour enlever les particules du sable et du terreau restantes. Les parties des racines contenant des galles sont coupées et posées sous un stéréomicroscope. Les masses d'œufs matures ont une couleur orange ou brune claire (**Figure 6**). Ces dernières sont enlevées à l'aide d'un scalpel (Speijer & De Waele, 1997) et collectées dans un tube de 1.5 ml Eppendorf contenant de l'eau distillée. Cette suspension est versée sur un petit tamis (maille > 200 µm). Ensuite, le tamis avec les masses d'œufs est déposé dans une boîte de Pétri en verre. L'eau distillée est ajoutée dans la boîte autour du tamis jusqu'à ce que le fond de tamis soit rempli d'eau et que les masses d'œufs commencent à flotter. Par la suite, la boîte de Pétri est déposée à l'obscurité à une température d'environ 28 °C pendant une semaine. Après cette incubation, la suspension contient les juvéniles J2, le stade infectieux. Le nombre total des juvéniles dans un volume donné est compté sous une loupe de stéréomicroscope (X 6) en utilisant une cellule de comptage de 2 ml (Nematode Counting Slide; Chalex Corporation, Washington, USA). Le comptage est répété plusieurs fois pour estimer la moyenne et la variance de la concentration des nématodes.

2.4. L'inoculation d'Arabidopsis par des nématodes *M. javanica*

Environ un mois après transfert des plantules d'Arabidopsis en pots de sable 1 ml de la suspension contenant les J2 de nématodes est inoculé dans un trou unique adjacent la tige principale de chaque plante. Dans les conditions de culture utilisées, ce temps correspond à l'achèvement de la rosette de feuilles d'Arabidopsis et le début de l'apparition de la tige principale. Avant chaque inoculation, la totalité de l'inoculum est bien mais prudemment mélangée afin d'assurer une inoculation homogène. La localisation des trous est la même pour tous les pots.

2.5. Evaluation phénotypique : l'analyse nématologique

L'analyse nématologique est effectuée 30 jours après l'inoculation d'Arabidopsis avec des nématodes. Pour éviter une éclosion des œufs de *M. javanica* pendant les analyses, la température de la

chambre de culture est baissée à 16 °C deux jour avant le début du phénotypage. Les températures basses retardent l'éclosion des œufs de *M. javanica* (Huang & Pereira, 1994).

Les racines sont lavées du sable en utilisant de l'eau dans un seau afin d'éviter la contamination de l'environnement avec des juvéniles de nématodes. Après le lavage des racines, l'eau dans le seau est incubée avec deux ou trois pastilles de l'hypochlorite de sodium pendant 48 heures afin d'éliminer les nématodes qui restent potentiellement dans le seau. Le comptage de galles est effectué en utilisant une loupe de stéréomicroscope. Les racines sont immergées dans une petite quantité d'eau lors de l'analyse afin d'éviter l'enchevêtrement entre les racines d'*A. thaliana* (**Figure 14**).



Figure 14. Des racines d'*A. thaliana* prêtes à l'analyse nématologique.

Pour colorer les masses d'œufs, les racines sont placées dans une solution de phloxine B (Merck, Allemagne) dans de l'eau à une concentration de 0,015% (w/v) pendant 15 – 20 minutes. Après, les racines sont lavées dans l'eau pour enlever les résidus de colorant, et les masses d'œufs sont comptées en utilisant un stéréomicroscope (Daykin & Hussey, 1985).

2.6. Croisements de plantes

Les fleurs ouvertes, les bourgeons et les siliques qui existent sur la branche florale qui va porter le croisement, sont retirées à l'aide de forceps et de ciseaux sous une loupe binoculaire; Ceci permet d'abaisser le nombre de graines produites par autofécondation et d'augmenter la quantité relative de graines produites issues du croisement (**Figure 15**). Le croisement est effectué entre des fleurs qui sont gonflées et incomplètement fermées (**Figure 15**) ; pour le partenaire femelle du croisement, les sépales et les pétales sont soigneusement retirées pour révéler les anthères, lesquels doivent être immatures pour que du pollen n'en soit pas libéré. Ensuite, les anthères sont retirées sans toucher au stigmate ou au style qui peuvent être facilement endommagés. L'anthère d'une fleur mature provenant d'une plante paternelle est frottée sur le stigmate d'une fleur de plante maternelle préalablement émasculée. Après avoir vérifié

que les pollens adhèrent au stigmate, les bourgeons restant sur la hampe qui porte les fleurs croisées sont enlevés pour éviter un mélange de siliques issues du croisement avec celles produites par autofécondation. Si le croisement est réussi, un allongement des siliques est observé trois jours après le croisement. Les graines sont récoltées à maturation mais avant l'éclatement des siliques.

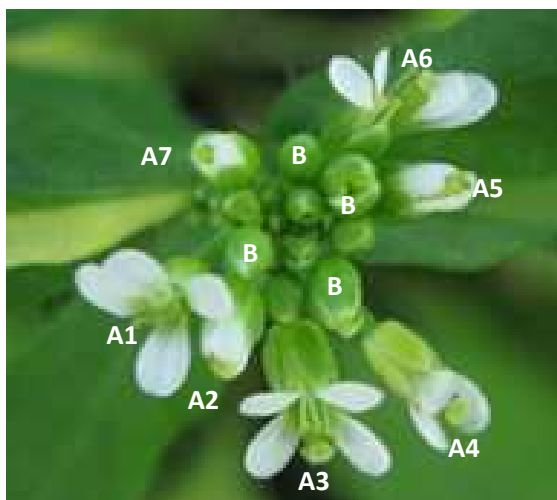


Figure 15. Position des organes floraux avant croisement chez *A. thaliana*. A1-A7. Les fleurs inutiles (à retirer), B. les bourgeons utilisés pour le croisement. (<http://www.swarthmore.edu/NatSci/nkaplin1/>)

2.7. Extraction d'ADN

Une jeune feuille de rosette est broyée à l'aide d'un pilon stérile dans un tube Eppendorf dans 500 µl de tampon d'extraction composé de 200 mM Tris pH 7,5 (Qbiogene-Krackeler Scientific Inc.), 250 mM NaCl (Sigma-Aldrich, Inc.), 25 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Inc.) et 0,5% (w/v) SDS (Carl ROTH, Inc.). Après rajout de 500 µl de tampon d'extraction, le tube Eppendorf est chauffé au Bain-Marie à 65 °C pendant une heure. 300 µl de tampon de précipitation (5 M Acétate de potassium (Carl ROTH, Inc.) sont alors ajoutés et l'extrait est centrifugé 15 minutes à 18000 *g*. 600 µl de surnageant sont versés dans un nouveau tube contenant 660 µl d'isopropanol, et l'extrait est à nouveau centrifugé pendant 10 minutes à 18000 *g*. Le culot obtenu est rincé dans un volume de 200 µl d'éthanol à 75% suivit d'une centrifugation pendant 5 minutes à 18000 *g*. Après élimination du surnageant, le culot est alors mis à sécher à la température ambiante et repris dans 300 à 400 µl de tampon 10 mM Tris pH 8 (Qbiogene-Krackeler Scientific Inc.) en le maintenant au Bain-Marie à 65 °C pendant 30 minutes. Afin d'éviter la présence d'éventuels débris en solution, le tube Eppendorf est centrifugé pendant 15 minutes à 2500 *g*.

Lorsque de grandes séries de plantes sont à génotyper, une plaque de 12 barrettes de 8 tubes de 1,2 ml (Micronic, USA), contenant trois ou quatre billes métalliques par tube, est utilisée. Une ou deux feuilles de rosette, selon l'âge de plante, a été introduite dans chaque tube. Ces feuilles ont été lyophilisées

pendant deux jours, puis broyées mécaniquement (broyeur Retsch-MM300, Allemagne) pendant deux minutes, en changeant la direction de la plaque chaque minute afin d'optimiser le broyage des feuilles. A chaque puits sont ensuite ajoutés 350 µl de tampon d'extraction en utilisant une pipette électronique avant de déposer la plaque dans un bain-marie à 65 °C pendant une heure, puis de rajouter 100 µl de tampon de précipitation. Ensuite, la plaque est centrifugée pendant 20 minutes à 2000 *g*, et 200 µl de la phase aqueuse sont transférés dans une nouvelle microplaque d'extraction en polypropylène de 96 puits (Eppendorf, Germany), contenant 220 µl d'isopropanol. Après centrifugation pendant 15 minutes à 2000 *g* et élimination des surnageants, chaque culot est rincé par 200 µl d'éthanol à 75%, puis la plaque est à nouveau centrifugée pendant 5 minutes à 2000 *g*. Le culot est alors mis à sécher pendant une nuit à température ambiante, à la suite de quoi sont ajoutés 200-300 µl de tampon de solution (10 mM Tris pH 8) par puits, et la plaque est incubée dans un bain-marie à 65°C pendant 30 minutes. Une ultime centrifugation pendant 15 minutes à 2000 *g* (Simon *et al.*, 2008) permet de précipiter d'éventuels débris au fond des puits.

2.8. Amplification par PCR

Les plantes sont génotypées par amplification PCR de l'ADN génomique extrait en utilisant deux amorces spécifiques de la séquence amplifiée, dites amorce sens (Forward primer en 5') et anti-sens (Reverse primer en 3'). A 5 µl d'ADN sont rajoutés 2 µl de tampon de PCR 10x (Qiagen, Allemagne), 0,4 µl de dNTPs à 10 mM/500 µl (Q-Biogene), 0,13 pmol d'amorce sens et 0,13 pmol d'amorce anti-sens (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific Inc.), 1,2 µl de MgCl₂ à 25 mM (Qiagen, Allemagne) et 0,15 µl de Taq polymérase d'ADN à 5 u/µl (Qiagen, Allemagne), complétés à 20 µl par de l'eau distillée.

La machine PCR (Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc.) effectue le programme suivant : 94 °C pendant 3 minutes, 42 cycles de 94 °C pendant 25 secondes, 55 °C pendant 25 secondes, et 72 °C pendant 30 secondes, suivit d'une étape à 72 °C pendant 3 minutes. A l'issue de la PCR, les échantillons sont refroidis à 4 °C ou 10 °C. Il faut noter ici que la température de l'hybridation et le temps de l'élongation sont changeable selon les amorces utilisées.

2.9. Electrophorèse sur gel d'agarose Métaphor

Après ajout d'un microlitre de tampon de charge ou Loading Dye (3,9 ml Glycérol (Laboratoires Gelbert-France), 0,0125 g Bleu de Bromophénol (Sigma-Aldrich, Inc.), 500 µl 10% SDS (Carl ROTH, Inc.), 200 µl 0,5M EDTA (Sigma-Aldrich, Inc.) et 5,4 ml de l'eau desionisée) à dix microlitres de produit PCR, l'ADN amplifié est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose en présence de tampon Tris-acétate-EDTA (TAE), lequel préparé comme suit: pour un litre de solution stock concentrée cinquante fois (50x) de

tampon TAE pH 8,0 contient 242 g de Tris Base, 57,1 ml d'acide acétique glacial et 100 ml d'EDTA 0,5 M dans 800 ml d'eau distillée, le tout ajusté à pH 8.0 avec de l'HCl et complété à 1 litre avec de l'eau distillée. Le gel d'agarose Métaphor (Lonza Rockland, Inc., USA) a été utilisé pour séparer les fragments de petites tailles. 4 g d'agarose Métaphor est ajouté à 100 ml de tampon TAE (Tris Acétate EDTA, détaillé ci-dessous) pour obtenir un gel à 4% d'agarose Métaphor.

2.10. Génotypage de plantes par microsatellites

Le marqueur microsatellite (répétitions de séquences simples ; en anglais 'simple sequence repeats' - SSR) est une séquence d'ADN formée par une répétition continue de motifs composés de 2 à 10 nucléotides (ex. atatatatata, cgcgcgcg). La longueur de ces séquences, c'est-à-dire le nombre de répétitions, peut être variable d'une espèce à l'autre, d'un individu à l'autre et d'un allèle à l'autre chez un même individu. La transmission génétique de ces séquences suit les lois de Mendel de l'hérédité. Chez les végétaux supérieurs, on estime qu'il y aurait en moyenne un microsatellite di- ou tri-nucléotidiques tous les 50 kb (Morgante & Olivier, 1993). Pour identifier des microsatellites et pour définir des amorces PCR, le logiciel EditSeq (DNASTAR, Inc.) est utilisé, en se basant sur la séquence de référence de l'accèsion Col-0 d'Arabidopsis disponible dans des bases de données sur internet (www.arabidopsis.org).

2.11. Génotypage par séquençage

Des amorces PCR sont définies à l'aide du logiciel EditSeq (DNASTAR, Inc.), se basant sur le génome référence de l'accèsion d'Arabidopsis Col-0. La taille théorique des produits PCR variait entre 400 et 2600 paires de bases (**Tableau 5**). L'amplification par PCR et l'électrophorèse des produits de la PCR sur gel d'agarose sont décrit auparavant, alors que cette fois un gel d'agarose standard 1% est utilisé. Les produits de PCR sont excisés du gel et soumis à une gel-purification avec un PCR clean-up & Gel extraction Kit (Macherey-Nagel, Allemagne) selon le protocole décrit dans le guide de l'utilisateur. Le séquençage selon la méthode développé par Sanger est conduit par Cogenics (Cogenics Inc., USA). Le logiciel SeqMan (DNASTAR, Inc.) est utilisé pour la comparaison des séquences des génotypes différents.

Tableau 5. Les marqueurs utilisés dans la cartographie fine par séquençage.

Marqueur	Amorce sens	Position	Séquence 5' → 3'	Amorce anti-sens	Position	Séquence 5' → 3'	Taille [bp]
Msatq2.2	Msatq2.2f	11940208	GTAACCAATAGCTTGCTGAAAC	Msatq2.2r	11940439	CTGAAACATAACATGACAGTCAG	231
SNP2	SNP2F	12000710	GATGATTCGTCTTCATCTTC	SNP2R	12001315	GTAGGTACAAGGCCGAAATTG	605
SNPz12	SNPz12F	12009918	GGCCATATTGGTCCACCAAC	SNPz12R	12011274	CCGGAATGGTAAAAGAAGAAAC	1356
SNPz4	SNPz4F	12014552	CTGCCACCAACAATCCTC	SNPz4R	12016294	CGTCAAGCCAATCACACCTG	1742
SNPz11	SNPz11F	12016221	CGCAAATTCGGACCATCTG	SNPz11R	12017771	GTGAGTTATCAGTCTATTGTTC	1550
SNPz13	SNPz13F	12017666	CTGACACAATTGATGTGACTTC	SNPz13R	12018842	GGGTGGCATACCAAATAGTAG	1176
SNPz10	SNPz10F	12030216	GGCCATGATATGATGGTATC	SNPz10R	12032204	CCCTTGGGTCAATCACATC	1988
SNP3	SNP3F	12041050	CTACACCTCCAAATCTTTCAG	SNP3R	12041680	GAGGATGGGGAGTTGAATTG	630
SNPz9	SNPz9F	12041572	GAAGCCCGTCTTTACATC	SNPz9R	12044090	GCTGAGTAGAACTAACCTC	2518
SNPz5	SNPz5F	12044009	GATGAGAGTGGAACCGCAC	SNPz5R	12046331	GTGCAGATGGTTCAAGCAAG	2322
SNPz6	SNPz6F	12050497	GCCTCCTCTCGTGATTTG	SNPz6R	12051984	CCATTGGTTGTGTAGGAATC	1487
SNPz7	SNPz7F	12053849	GATCCATCACAAGTCTCACAC	SNPz7R	12054957	CTTGGCGAATCTAGAGACAAG	1108
SNPz2	SNPz2F	12063232	GAGAGATTGATACGCTGTGAG	SNPz2R	12065075	CAGCGGTTATACTCTGGTTAG	1843
SNP4	SNP4F	12071915	GTTCTGTCAGAACCAAGTTC	SNP4R	12072525	GAGTTCTGAACCTTCAGTAAC	610
SNPz3	SNPz3F	12094858	CCACTACCTTCGTATCTTC	SNPz3R	12096862	GTCTTCCCTTCTCCAGTAAC	2004
SNP5	SNP5F	12124605	CTCCAAAAGTGAATCTCTTG	SNP5R	12125215	CATTCCAAGATGACAGATTTC	610
SNPx1	SNPx1F	12125340	GAATCTGTATCTTGAATGTG	SNPx1R	12126701	CTCTCCATCACCACCTGGAG	1361
SNPx2	SNPx2F	12126631	GATTGCAATCTTGAAGGATATG	SNPx2R	12128160	GGTTCGCTTGGTTGGAGCTG	1529
SNPx3	SNPx3F	12128089	GATCATTTCAAGTAAATCGTATC	SNPx3R	12129569	GTGGAGTCGATACTAGACAAAAG	1480
SNPx4	SNPx4F	12129495	GAGTCGGCTATTCAAAGCTTTG	SNPx4R	12130954	GTTTCGCATAACTCGGGTGTC	1459
SNPx5	SNPx5F	12130870	CGTCGCTGATCGAAGAACATAC	SNPx5R	12132288	CCAGAAGGCGGTAACGGAAG	1418
SNPx6	SNPx6F	12132201	GAACATTGCTTGGTCTTGCAATTG	SNPx6R	12133420	GGATGCAAGAGACCAGAAATTG	1219
SNPx7	SNPx7F	12133290	CATCGGCAGGCATAACGGTTC	SNPx7R	12134126	GGAGAACC GGAGACAGCAAG	836
SNP11	SNP11F	12134130	CTGTCTCCGGTCTCTCTTTC	SNP11R	12134793	GAGTGCCCCAGTTCATTTC	663
SNPy1	SNPy1F	12136573	CGGCAGAATCTATAACAACAC	SNPy1R	12138350	CAAGGGAGAGTATTCCTCTC	1777
SNPy2	SNPy2F	12140916	GGCCTGAGCGTTGTATCTTG	SNPy2R	12142675	CAGCGGTAGATGGAACCTCTG	1759
SNP12	SNP12F	12142560	GGTTTGCCTGAGTTACTCAG	SNP12R	12143353	GCGACTTCAGATTTCGAGGTC	793
SNPy3	SNPy3F	12147055	GTTAGACCGTAAGATGATTCTC	SNPy3R	12148699	GGAAGAAGTTGACGGAGATG	1644
SNP13	SNP13F	12148576	CAAAGTCCTCCAGCACCTTC	SNP13R	12148977	CGACGAGCAAGTGCTACTATC	401
SNP6	SNP6F	12161308	CCTTCACCTGCTGCTGTCTC	SNP6R	12161880	CTTCACCTCTTCGTCATTG	572
SNP7	SNP7F	12199420	GATGAAACCATCCATTCCAG	SNP7R	12199945	CCTCTTCTCAGCTTTCTC	525
SNP8	SNP8F	12247107	CAAAGAGTTCAGGAGAATCATC	SNP8R	12247625	CTCCTGCACTGTCTAGTTTG	518
SNPa1	SNPa1F	12301661	CGCAGCTGCAAAAGTAACAAC	SNPa1R	12303393	CTGATGGCTTGTCTTGTTTC	1732
SNP10	SNP10F	12317980	CTGGAATGCAAAATGTCTTGC	SNP10R	12318505	GTTACCGGAGACCCAAAAG	525
SNPa2	SNPa2F	12354706	GTCATGCATAAGCGAAGGAC	SNPa2R	12356686	CGGAAACGCACTGTATAGAAC	1980
SNPa3	SNPa3F	12367110	CCTGGTTTAACCAACAGCTAC	SNPa3R	12368486	CGCAAAGCGGCACAGTTAC	1376
SNPa10	SNPa10F	12371988	CCATTGGACAAGCATAGCTC	SNPa10R	12373412	GTGGATCTAAATGTCGTATGTG	1424
SNPa4	SNPa4F	12378548	CAGAGTATGAGCTGTGGAAG	SNPa4R	12380417	GCCGGTTATCCTACCGAATG	1869
SNPa5	SNPa5F	12383847	CTAACAGCAACATGTGGGACC	SNPa5R	12384886	GAGCAACTCTTTTACCGTCTC	1039
SNPa6	SNPa6F	12386043	GCAAAGCGGCTTTTGACATAC	SNPa6R	12387144	GAAATCGAAACCAAGTTCAC	1101
SNPa7	SNPa7F	12388709	CTAACAGCAACATGTGGAATC	SNPa7R	12389748	GAGCAACTCTTTTACCGTGTC	1039
SNPa8	SNPa8F	12394519	CGCCGGTGGACAAATCTTG	SNPa8R	12395672	CGATGTTACATGCATCAAAG	1153
SNPa9	SNPa9F	12400001	GCAGTTCCCTCTTCGTAAAG	SNPa9R	12401936	GCCATTCTGCAGGTTGTTAG	1935
SNPa11	SNPa11F	12401839	GTGTCATCATAAATCGTCCAC	SNPa11R	12404199	CCATCGCCTCTTCGAATGAG	2360
Msatq2.7	Msatq2.7f	12404734	GCTATCCATCTCTATCATGTG	Msatq2.7r	12405002	CCAAGATAATGTAAGTCTGTTC	268

III.12. Analyses statistiques

L'analyse de variance (ANOVA) et les tests *t* sont conduits avec le logiciel Systat 9 (SPSS Inc.). Le logiciel WinQTL cartographer 2.5 (Wang *et al.*, 2012b ; <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>) est utilisé pour la cartographie d'intervalle composite de QTL. Généralement, le modèle standard (Modèle 6) est utilisé, en variant plusieurs paramètres de contrôle pour tester la stabilité des résultats. Ces paramètres incluent le type de régression (régression vers l'avant ou vers l'arrière), le nombre de marqueurs de contrôle du fond génétique (entre 5 et 10), et la taille de la fenêtre qui limite les deux côtes des marqueurs flanquant le site testé (2, 8, ou 10 cM). Les QTL sont scannées à une vitesse de marche de 0,5 cM. La signification statistique de QTL est évaluée par 1000 permutations des données avec un seuil de signification de 0,05. Le logiciel R/qtl (Broman *et al.*, 2003) est utilisé avec des paramètres standards prédéfinis pour des tests de QTL épistatiques potentiels.

Résultats

3. Analyse de la variation génétique naturelle de la résistance

3.1. Introduction

Les approches de la génétique quantitative, et notamment de la cartographie des QTL, sont fondées sur la variation génétique naturelle. La variation génétique naturelle chez *Arabidopsis thaliana* a été exploitée avec succès pour identifier des QTL pour une multitude de caractères (Alonso-Blanco & Koornneef, 2000 ; Koornneef *et al.*, 2004 ; Shindo *et al.*, 2007 ; Alonso-Blanco *et al.*, 2009) y compris la défense des plantes contre certains ennemis naturels (Kliebenstein *et al.*, 2002; Kroymann *et al.*, 2003; Pfalz *et al.*, 2007; 2009). Selon Gheysen & Fenoll (2011), il est bien connu que certaines accessions d'*Arabidopsis* sont meilleures hôtes pour des nématodes que d'autres. Plusieurs espèces de nématodes phytoparasites peuvent compléter leur cycle de vie sur *Arabidopsis*, incluant les nématodes à galles *M. incognita*, *M. arenaria* et *M. javanica*, les nématodes à kyste *Heterodera schachtii*, *Heterodera trifolii* et *Heterodera cajani*, et les nématodes à lésion du genre *Pratylenchus* sp. (Sijmons *et al.*, 1991 ; Wu *et al.*, 1998). De plus, il a été montré qu'il y avait des différences entre des accessions d'*A. thaliana* en ce qui concerne le nombre de galles causés par les nématodes sur ses racines et le taux de reproduction des femelles de nématodes (Sijmons *et al.*, 1991 ; Boiteux *et al.*, 1999).

D'un autre côté, *Arabidopsis* est devenue un modèle pour des études cellulaires et moléculaires des interactions plante – nématodes (Sijmons *et al.*, 1991 ; Favery *et al.*, 1998 ; Williamson, 1999 ; Fuller *et al.*, 2008 ; Tamarasani & Rajam, 2013). C'est alors très surprenant que la variation génétique naturelle d'*Arabidopsis* envers les nématodes n'a jamais été exploitée par une approche de cartographie de QTL (Gheysen & Fenoll, 2011).

Néanmoins, une telle approche de cartographie de QTL nécessite des conditions expérimentales bien contrôlées : La relation entre le phénotype et le génotype d'un individu est influencée par l'effet de l'environnement sur le phénotype. Au niveau d'une population, la variance phénotypique est composée de la variance génétique dans la population, la variance environnementale, et la variance de l'interaction entre le génotype et l'environnement. De ce fait, dans une expérience, la capacité de détecter la contribution du génotype au phénotype dépend des conditions expérimentales homogènes. Or, quelques protocoles classiquement utilisés pour étudier les interactions entre plantes et nématodes comportent un certain risque d'augmenter la variance expérimentale : Ces protocoles incluent (i) l'utilisation de l'hypochlorite de sodium (NaOCl) pour dissoudre la matrice gélatineuse protégeant les masses d'œufs de nématode (Sijmons *et al.*, 1991 ; Speijer & De Waele, 1997 ; Boiteux *et al.*, 1999 ; Mitchum *et al.*, 2004 ; Jammes *et al.*, 2005), et (ii) le traitement de juvéniles et de masses d'œufs de *Meloidogyne* spp. avant l'inoculation par le sulfate de streptomycine (Speijer & De Waele, 1997) ou par le chlorure mercurique HgCl₂ (Sijmons *et al.*, 1991). Chez les nématodes à galles dans leur état naturel, les juvéniles s'activent dans les œufs d'abord et modifient les coquilles d'œufs, suivi par l'éclosion (Perry, 2002). Alors que le traitement des masses d'œufs avec de tels

produits chimiques peut fragiliser les coquilles d'œufs, provoquant la libération des larves avant leur activation en résultant probablement une éclosion anormale ou précoce des larves de nématodes peut engendrer des juvéniles qui sont mal-développées et/ou non activées, et en conséquence, l'inoculum de nématodes ne sera pas homogène.

3.2. Résultats

L'effet de l'inoculation avec *M. javanica* sur plusieurs accessions d'*A. thaliana* a été testé, dont Col-0 (accession référence du génome), Cvi (origine : le Cap-Vert), Da(1)-12 (République tchèque), Ei-2 (Eifel, Allemagne), Ler (Landsberg, Pologne), et Nok-1 (Noordwijk, Pays-Bas). Ces accessions ont été choisies parce que des populations RILs génotypées existent déjà pour certaines combinaisons de croisements entre eux (Lister & Dean, 1993 ; Alonso-Blanco *et al.*, 1998 ; Pfalz *et al.*, 2007 ; Simon *et al.*, 2008).

Dans une première expérience, 12 plantes de chaque accession, 3 par plateau avec 4 plateaux en totales, avaient été inoculées avec 30-35 juvéniles J2 de nématodes. Malheureusement, l'infection était efficace uniquement sur 2 des 4 plateaux. Sur les 2 plateaux où l'infection échouait, les plantes ont eu un taux moyen de 0,1 galles par plante sur l'un et 1,1 sur l'autre. Sur les autres deux plateaux, 3 plantes de l'accession Cvi ont été mortes avant l'inoculation avec des nématodes. Alors, seulement 6 plantes répliquées par accession (3 pour Cvi) sur 2 plateaux restaient pour l'analyse statistique. Les données ont été traitées en utilisant un modèle mixte d'ANOVA. L'accession a été traitée comme un effet fixe, et le plateau et l'interaction entre plateau et accession ont été traités comme des effets aléatoires, afin d'obtenir les carrés moyens (CM) pour l'accession, le plateau, et l'interaction dans le modèle « Nombre de galles = Constante + Plateau\$ + Accession\$ + Plateaux\$*Accession\$ », où le facteur 'Plateau\$' corrigeait la variation entre les plateaux. Les ratios de *F* ont été calculés comme « $F = \text{CM}_{\text{Accession}} / \text{CM}_{\text{plateaux} \times \text{Accession}}$ ».

L'ANOVA révélait une hétérogénéité statistiquement significative pour le nombre de galles entre les accessions ($F_{5,5} = 10,16$; $p < 0,025$), avec un nombre de galles élevé pour les accessions Col et Ei-2, un nombre bas pour Cvi, Da(1)-12 et Ler, et une valeur intermédiaire pour Nok-1 (**Figure 16 à gauche, Tableau 6**).

Cette expérience a été répétée, en augmentant le nombre de juvéniles dans l'inoculum à 82,5 ($\pm 2,5$ SEM) par plante afin d'obtenir un meilleur degré d'infection. Les mêmes 6 accessions d'*Arabidopsis* ont été utilisées avec 17-18 plantes par accession. Chaque plateau comportait 3 plantes de chaque accession. Comme avant, les données ont été traitées en utilisant un modèle mixte d'ANOVA.

La hétérogénéité pour le nombre de galles formées sur les racines étaient hautement significatives entre les accessions ($F_{5,25} = 38,04$; $P < 0,0001$). Comme avant, le nombre de galles était plus élevé sur les

racines des accessions Col-0, Ei-2 et Nok-1, étant presque deux fois plus élevé que le nombre de galles sur les racines des accessions Ler, Da(1)-12 et Cvi (**Figure 16 à droite, Tableau 6**).

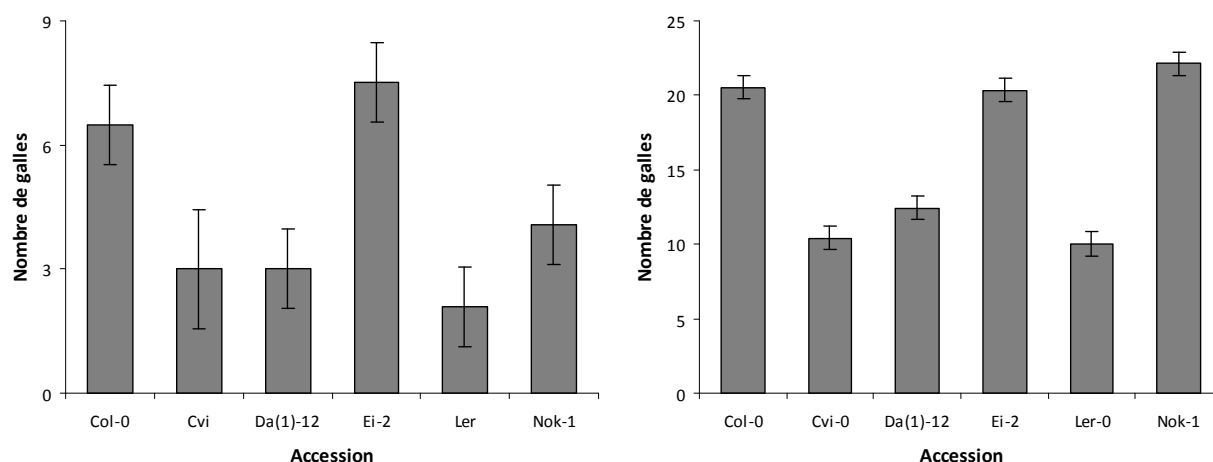


Figure 16. Le nombre moyen (\pm SEM) de galles provoquées par *M. javanica* sur les racines de 6 accessions d'*Arabidopsis* dans deux expériences indépendantes. À gauche : Inoculation avec 30 – 35 juvéniles de nématodes. Chaque accession avait 6 réplicats distribués sur 2 plateaux, sauf Cvi qui avait seulement 3 réplicats à cause de la mort de 3 plantes. A droite : Inoculation avec 82,5 (\pm 2,5 SEM) juvéniles des nématodes. Chaque accession avait 17 – 18 plantes distribuées sur 6 plateaux.

Pas seulement le nombre de galles variait, des autres différences ont été également observées mais ces autres différences n'ont pas été quantifiées. Les galles des accessions Cvi, Ei-2 et Nok-1 étaient plus grandes (**Figure 17 A, E, F, G et H**) que les galles sur les racines des autres accessions (**Figure 17 B, C et D**). De plus, on a pu observer des masses d'œufs en formation sur les grandes galles sur les racines des accessions Col-0, Cvi, Ei-2 et Nok-1. Par contre, aucune masse d'œufs n'était observée chez Ler et Da(1)-12. Finalement, les galles sur les racines des accessions Cvi, Ei-2 et Nok-1 étaient, en générale, regroupées en clusters (**Figure 17 E et F**) ; cependant, sur les racines des accessions Col, Da(1)-12 et Ler, les galles étaient individuellement séparées (**Figure 17 B, C et D**).

Tableau 6. Le nombre de galles provoquées par *M. javanica* sur les racines de 6 accessions d'*Arabidopsis*. Le tableau montre les résultats de deux expériences indépendantes. La première expérience a été conduite sur deux plateaux (Flat A et Flat B), chacune avec 3 plantes par accession (à gauche), la deuxième expérience a été conduite sur six plateaux (Flat 1 – Flat 6), également avec 3 plantes par accession et plateau (à droite). Les nombres non-entiers indiquent des ambiguïtés mineures dans le comptage de galles, où ce n'était pas clair si une galle était unique ou composée de deux galles en extrême proximité. Par exemple, une valeur = 8.5 indique que le vrai nombre de galles était soit 8, soit 9 galles.

	Expérience 1		Expérience 2					
Accession	Flat A	Flat B	Flat 1	Flat 2	Flat 3	Flat 4	Flat 5	Flat 6
Col-0	3	7	16	30	21	14	28	13
Col-0	7	13	20	22	18	27	24	10
Col-0	6	3	19	28	22	25	21	-
Cvi	4	2	15	14	8.5	11	8	5
Cvi	4	-	14	10	13	15	11	0
Cvi	-	-	16	12	10	7	12	6
Da(1)-12	2	3	11	18	19	10	15	5
Da(1)-12	5	4	14	11	13	14	11	8
Da(1)-12	2	2	15	9	14	9	14	14
Ei-2	7	9	21	28	25	20	20	16
Ei-2	8	10	23	21	20	22	21	16
Ei-2	5	6	19	25	16	18	23	12
Ler	2	1	6	13	9	13	16	5
Ler	1	3	9	15	8	8	14	4
Ler	2	3.5	10	12	11	-	11	6
Nok-1	3	4	27	30	14	18	23	21
Nok-1	8	6	23	23	19	24	26	11
Nok-1	2	1.5	26	19	21	27	28	18

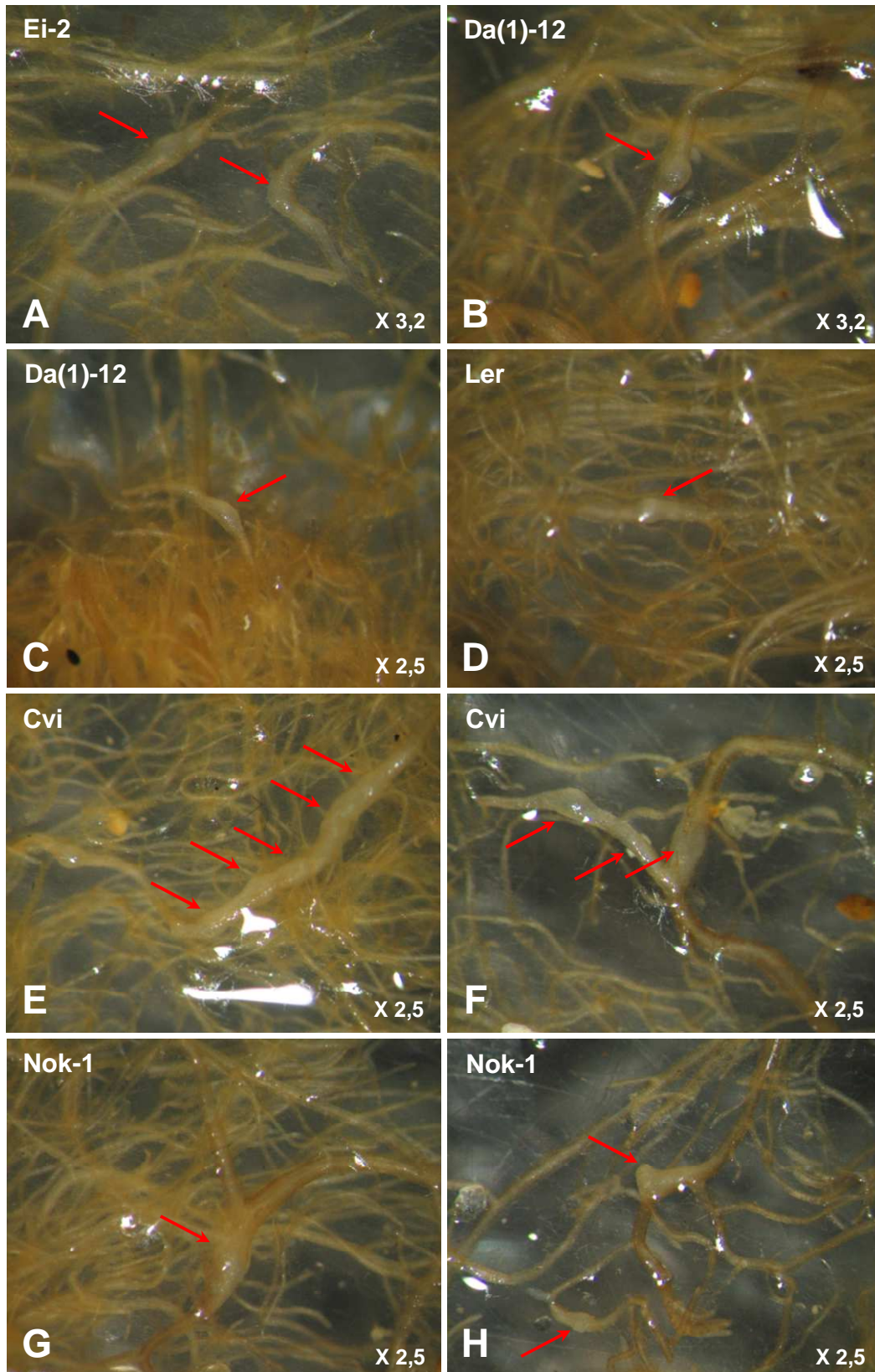


Figure 17. Des galles provoquées par *M. javanica* sur les racines de différentes accessions d'*Arabidopsis*. A. Ei-2 ; les flèches rouges montrent 2 galles bien développées. B et C, Da(1)-12 ; les galles sur les racines de l'accension Da(1)-12 sont en générale plus petites et moins développées que les galles sur Ei-2. D, Ler. E et F, Cvi ; les flèches rouges montrent des clusters de galles. G, Nok-1 ; la flèche rouge montre une grande galle contenant plusieurs femelles. H, Nok-1 ; les flèches rouges montrent des galles en début de production de masses d'œufs.

3.3. Discussion

Les conditions expérimentales utilisées ici pour explorer la variation génétique naturelle des accessions d'*Arabidopsis* dans leur interaction avec *M. javanica* divergent dans plusieurs aspects des études précédemment décrites dans la littérature (Sijmons *et al.*, 1991 ; Wu *et al.*, 1998 ; Boiteux *et al.*, 1999). En particulier on a évité l'utilisation des substances chimiques pour décontaminer les masses d'œufs ou les juvéniles de nématodes, ou pour dissoudre la matrice gélatineuse protégeant les masses d'œufs. Au lieu de cela, dans les conditions expérimentales mis en place ici, l'éclosion des juvéniles de nématodes se produisait quasi naturellement, sans stimulant artificiel.

De plus, l'inoculation d'*Arabidopsis* par des juvéniles de nématodes se passait dans un substrat de sable et non pas *in vitro*. Le sable semblait d'être un bon compromis entre les conditions favorables pour *Arabidopsis* et pour les nématodes. De plus, cela facilite le nettoyage des racines pour les analyses nématologiques qui suivaient.

Finalement, le nombre de J2 dans l'inoculum était faible en comparaison avec l'inoculum décrits dans certaines publications (Boiteux *et al.*, 1999). Néanmoins, pour les accessions qui portaient un nombre de galles important, le taux de succès d'infection était d'environ 25% des juvéniles de nématodes inoculés, estimés sur deux expériences indépendantes (**Figure 16, Tableau 6**). En fait, cette valeur montre que les protocoles mis en place ici sont capables d'aboutir à un bon taux d'infection d'*Arabidopsis* par *M. javanica*.

Dans ces deux expériences indépendantes, il était testé si des accessions d'*Arabidopsis* se varient en nombres de galles provoquées par les nématodes à galles *M. javanica*. Les deux expériences, conduites avec des concentrations différentes de l'inoculum de nématodes, donneraient essentiellement les mêmes résultats : trois accessions, Col-0, Ei-2 et Nok-1, avaient plus de galles sur leurs racines que Cvi, Da(1)-12 et Ler. Ce résultat était extrêmement important pour les étapes suivantes de l'analyse quantitative de l'interaction entre *Arabidopsis* et *M. javanica*, en indiquant qu'il existait vraiment une variation génétique naturelle (et reproductible) entre les accessions d'*Arabidopsis*, au moins concernant le nombre de galles provoquées par *M. javanica* sur les racines d'une accession donnée.

Ces analyses laissent, pour le moment, la question qu'on pose est-ce que le nombre de galles formées sur le système racinaire d'une accession d'*Arabidopsis* est un bon indice pour la résistance contre les nématodes à galles?. Pour une population de nématodes à galles qui envahit une plante, son succès se mesure par le nombre de sites nourriciers établis dans les cellules racinaires de la plante et par le nombre d'œufs produits par une femelle. Pour la plante, son succès de résister à l'attaque des parasites se mesure dans sa capacité d'empêcher les nématodes de prélever ses ressources et d'empêcher des dégâts secondaires. Ces dégâts secondaires incluent la perturbation du système vasculaire de la plante par la

formation de galles, et des lésions qui sont causées par des nématodes et qui peuvent entraîner des infections par des autres agents phytopathogènes.

Deux mesures sont très répandues dans la littérature pour estimer ces paramètres de fitness. L'une se focalise sur le nombre de galles observé sur le système racinaire de la plante, appelé l'indice (ou le nombre) des galles. L'indice de galles selon Zeck (1971) prend en compte le nombre de galles, leur taille et leur position sur les racines. L'indice de galles selon Taylor et Sasser (1978) classifie le nombre de galles sur une échelle à 6 niveaux (**0** = non galles, **1** = 1–2, **2** = 3–10, **3** = 11–30, **4** = 31–100, **5** ≥ 100 galles par système racinaire). L'autre mesure, appelé le taux de fécondité des femelles, compte les masses d'œufs sur une partie représentative du système racinaire ou sur le système entier (Taylor & Sasser, 1978 ; Janssen *et al.*, 1997 ; Boiteux *et al.*, 1999). L'indice de galles se focalise plutôt sur les dégâts causés sur la plante, tandis que le taux de fécondité saisit plutôt le succès reproducteur d'une population des nématodes. Ces deux indices ne sont pas toujours strictement corrélés ; il était déjà observé qu'un indice de galles élevé peut être associé avec un faible taux de fécondité chez certains accessions d'*Arabidopsis* (Boiteux *et al.*, 1999). De même, c'est possible qu'une galle contient plusieurs femelles, aboutissant à l'attachement des plusieurs masses d'œufs à une seule grande galle ; voir **Figure 6**. De plus, ces deux mesures ont des répercussions différentes pour la biologie des plantes, des nématodes et de l'interaction. L'indice de galles renseigne sur les effets néfastes de nématodes sur la plante au moment de l'infection. Le taux de fécondité renseigne sur la reproduction des nématodes, qui influence, bien évidemment, leur dynamique de population et leur capacité à contaminer des hôtes par des infections secondaires. Cette deuxième mesure est plus pertinente pour des cultures pérenne ou durable dans la saison que pour des hôtes à courte durée de vie, comme *Arabidopsis*. En effet, *Arabidopsis* boucle son cycle à la même périodicité que les *M. javanica* aux lesquelles elle est l'hôte et donc n'est pas disponible pour être infectée par la nouvelle génération de *M. javanica*. De ce fait, la mesure de taux de fécondité des nématodes a de moindre pertinence pour *Arabidopsis*.

Les températures favorisées pour *Arabidopsis* sont modérées, typiquement d'environ 16 – 23 °C pour la plupart des accessions (Rivero *et al.*, 2014), alors que la température optimale pour le développement de nématodes à galles *M. javanica* est d'environ 28 °C (Madulu & Trudgill, 1994 ; Trudgill, 1995). Le début de formation des masses d'œufs a été observé au jour du prélèvement des échantillons, 30 jours après l'inoculation des plantes avec les nématodes, suggérant que *M. javanica* aurait besoin de plus d'un mois pour compléter son cycle de vie dans les conditions de culture utilisées ici. De fait, des masses d'œufs bien développées, présentes sur la majorité des galles du système racinaire d'*Arabidopsis*, ont été observées deux mois après l'inoculation d'*Arabidopsis* avec des nématodes, dans une expérience décrite plus tard (voir **4.2.**). Or, à cause des contraintes temporelles, ce n'était pas possible d'attendre systématiquement la fin de la reproduction des femelles afin d'enregistrer le taux de fécondité. Au lieu de

cela, le nombre total de galles a été utilisé comme un indicateur pour quantifier la résistance contre *M. javanica* chez les accessions d'*Arabidopsis*.

Néanmoins, la population RIL utilisée dans l'étape suivante, la cartographie de QTL, a été soigneusement sélectionnée, se basant sur les différences de nombre de galles mais aussi sur les autres observations faites sur la taille, la distribution et l'organisation des galles dans les systèmes racinaires des accessions. Les accessions Col-0, Cvi, Da(1)-12, Ei-2, Ler, et Nok-1 ont été utilisés comme lignées parentales pour la génération de populations RIL Ler x Col-0 (Lister & Dean, 1993), Ler x Cvi (Alonso-Blanco *et al.*, 1998), Da(1)-12 x Ei-2 (Pfalz *et al.*, 2007), Cvi x Col et Nok-1 x Col-0 (Simon *et al.*, 2008). La population Ler x Cvi est dérivée de deux accessions qui tous ont montrés des nombres de galles faibles, et Nok-1 x Col-0 résulte d'un croisement entre deux accessions à nombre de galles élevés. Chacune des trois autres populations RIL combine une accession à nombre de galles élevé et une accession à nombre de galles faible. Or, l'accension Cvi avait eu de grandes galles bien développées, même si le nombre total de galles sur ces racines était faible, ce qui suggère que le nombre de galles ne pas fiable comme un indicateur de la résistance de cette accession contre *M. javanica*. Les deux populations RIL qui restaient, Ler x Col-0 et Da(1)-12 x Ei-2, avaient des avantages similaires pour une approche de cartographie de QTL employant les différences de nombre de galles comme caractère indicateur. Cependant, il y avait d'autres différences pour la forme et l'organisation des galles, qui étaient plus prononcées entre les accessions Da(1)-12 et Ei-2 qu'entre Ler et Col-0. Finalement, la décision était pris d'utiliser Da(1)-12 x Ei-2, une population RIL avec laquelle on a de l'expérience antérieure dans notre équipe de recherche (Pfalz *et al.*, 2007 ; 2009).

4. La relation entre le nombre de galles et le nombre de masses d'œufs

4.1. Introduction

Deux paramètres sont souvent utilisés pour évaluer la résistance aux nématodes à galles *Meloidogynes spp.* chez leurs plantes hôtes : l'indice de galles provoquées par ces phytoparasites sur les racines de la plante (Zeck, 1971 ; Taylor et Sasser, 1978), et l'indice de reproduction qui est mesuré par le nombre de masses d'œufs produits par femelle de nématode (Taylor & Sasser, 1978 ; Janssen *et al.*, 1997 ; Boiteux *et al.*, 1999). Les deux paramètres sont relativement faciles à évaluer, mais les deux valeurs ne sont pas toujours corrélées. D'abord, le nombre de galles est fixé, et les œufs se développent au fur et à mesure. En plus, il est possible que certaines femelles de nématodes ne produisent pas d'œufs ; donc, on peut trouver un grand nombre de galles associé avec un taux de reproduction de femelles de nématodes modeste (Boiteux *et al.*, 1999).

4.2. Résultats

Des inoculations avec un nombre contrôlé de juvéniles de nématodes ont été effectuées afin de tester la relation entre le nombre de galles provoquées par *M. javanica* sur les racines d'une plante et le nombre de masses d'œufs produits par les femelles de ce phytoparasite, et ainsi pour répondre à la question si le nombre de galles est une bonne indice pour la résistance des plantes aux nématodes à galles dans les conditions expérimentales utilisées ici. Deux séries à 10 plantes de la génération F3 de chacune de quatre lignées recombinantes (Q2A/28, Q2A/83, Q2A/91 et Q2A/92 ; une description des lignées se trouve dans le chapitre 6) ont été inoculées avec deux doses différentes des juvéniles J2 de *M. javanica* : une dose plus forte, à 124 ($\pm 3,2$ SEM) par plante et une dose plus faible, à 54 ($\pm 4,16$ SEM) par plante. Les plantes ont été distribuées aléatoirement dans l'espace de la chambre de culture, et leurs positions avaient été changées chaque jour aléatoirement. Les génotypes aux intervalles recombinantes ségrégaient dans la génération F3 ; alors les plantes représentaient un mélange des génotypes homozygote D, homozygote E, et hétérozygote aux ces intervalles. Dans cette expérience, l'inoculation des plantes par les nématodes était effectuée 10 jours après le transfert des plantes aux pots contenant du sable. Le nombre de galles et le nombre de masses d'œufs ont été comptés 60 jours après inoculation des plantes, en utilisant le phloxine B pour colorer les masses d'œufs afin de faciliter leur comptage.

La majorité des juvéniles de nématodes inoculées, mais pas tous, ont réussi à induire des galles. Pour la faible dose de 55 juvéniles de nématodes, en moyenne 36,0 galles (écart-type : 6,6) ont été formées par plante, indiquant un taux d'infection d'environ 65%. Pour la plus forte dose de 123 juvéniles de nématodes/plante, en moyenne 70,6 galles (écart-type : 12,5) ont été formées par plante, indiquant un taux d'infection d'environ 57%. Nous avons analysé, avec un ANOVA à deux facteurs en utilisant le modèle

« Nombre de galles = Constant + Inoculum + Lignée\$ + Inoculum*Lignée\$ », le nombre de galles par plante en fonction de dose d'inoculum, la lignée, et l'interaction entre ces deux facteurs. Les influences de la lignée et de l'interaction entre la lignée et la dose d'inoculum étaient non-significatives ($F_{3,72} < 2,02$; $P > 0,1$) ; par contre, il y avait plus de galles sur les plantes qui étaient inoculées avec la plus forte dose de juvéniles de nématodes ($F_{1,72} = 244,42$; $P < 0,0001$). Nous avons analysé, également avec la même modèle d'ANOVA à deux facteurs, le succès d'infection par les juvéniles de nématodes inoculées. Les influences de la lignée et de l'interaction entre la lignée et la dose d'inoculum étaient non-significatives ($F_{3,72} < 2,13$; $P > 0,1$) ; par contre, le succès d'infection par les juvéniles de nématode inoculées était plus faible pour l'inoculum à plus forte dose ($F_{1,72} = 10,85$; $P = 0,0015$).

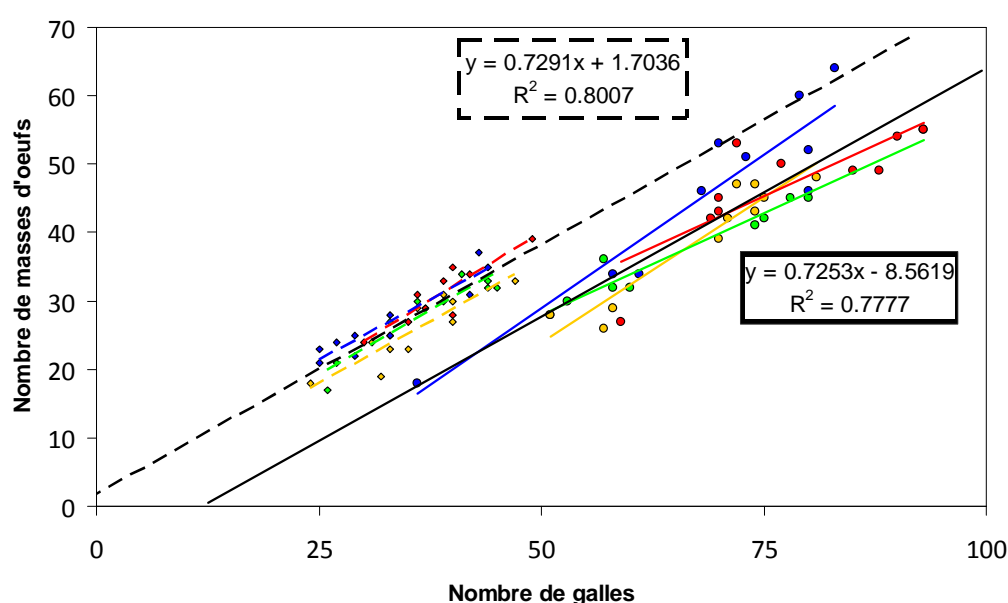


Figure 18. Relations entre le nombre de masses d'œufs et le nombre de galles dans des lignées recombinantes inoculées à deux doses différentes de juvéniles de nématodes. Les valeurs ont été mesurées pour les plantes F3 des lignées Q2A/28 (symboles verts), Q2A/83 (symboles rouges), Q2A/91 (symbole jaunes) et Q2A/92 (symboles bleus), qui ont été inoculées avec $54 (\pm 4,16 \text{ SEM})$ nématodes (losanges) et $124 (\pm 3,2 \text{ SEM})$ nématodes (ronds). Par lignée et dose il y avait 10 plantes. Les courbes de tendances de la régression linéaire pour chaque lignée sont indiquées en couleurs correspondantes aux symboles, et pointillées (faible dose) ou solides (plus forte dose). Les courbes de tendance en noir montrent la régression linéaire sur l'ensemble des 40 échantillons pour les deux doses, et leurs équations et coefficients de détermination (R^2) sont indiqués. Ces courbes ont été prolongées en avant et en arrière pour faciliter la comparaison entre eux et avec les courbes de tendance de la régression linéaire des lignées individuelles. Notez que ces courbes de tendance sont presque parallèles, mais décalées l'un par rapport à l'autre, selon le nombre de nématodes avec lequel les plantes ont été inoculées, et avec une pente toujours inférieure à 1.

Pour les deux doses d'inoculum, le nombre de masses d'œufs augmentait significativement avec le nombre de galles (faible dose : $N = 40$; $t = 12,36$; $P < 10^{-5}$; coefficient de détermination, $R^2 = 0,80$; plus forte dose : $N = 40$; $t = 11,53$; $P < 10^{-5}$; $R^2 = 0,78$; **Figure 18**). Les deux pentes ne différaient pas significativement l'une de l'autre (faible dose : pente = $0,729 \pm 0,059 \text{ SEM}$; plus forte dose : pente = $0,725 \pm$

0,063 SEM), mais les deux pentes sont plus faible que 1. Ce résultat est significatif car la pente plus 2 fois l'écart-type est moins que 1. L'analyse individuelle de chaque lignée recombinante aux deux doses d'inoculum montrait que la corrélation entre le nombre de masses d'œufs et le nombre de galles par plante était toujours très élevé, variant entre le minimum de $r = 0,81$ pour la lignée Q2A/83 et le maximum de $r = 0,98$ pour Q2A/28, les deux valeurs extrêmes de corrélation trouvées pour l'inoculation à plus forte dose. Toutes ces corrélations étaient statistiquement significatives ($N = 10$; $P \leq 0,005$).

Comme les résultats présentés auparavant montrent, des masses d'œufs étaient attachées seulement à certaines des galles, et pas toutes les galles, 60 jours après l'inoculation. En moyenne, 28,0 (écart-type : 5,33) et 42,6 masses d'œufs (écart-type : 10,3) par plante ont été trouvés pour les deux doses d'inoculum. Le succès reproducteur par galles était calculé en divisant le nombre de masses d'œufs par le nombre de galles par plante. Le résultat de cette équation donne un taux de reproduction d'environ 78% à faible dose d'inoculum et d'environ 60% à dose plus élevée. **Figure 19** résume ces résultats. Une ANOVA à deux facteurs, en utilisant le modèle « Nombre de masses d'œufs par galles = Constant + Inoculum + Lignée\$ + Inoculum*Lignée\$ » montrait que la faible dose d'inoculum engendrait des galles avec un plus fort succès reproducteur ($F_{1,72} = 158,41$; $P < 10^{-7}$). Le succès reproducteur des nématodes variait également entre les lignées ($F_{3,72} = 8,62$; $P < 10^{-4}$), et l'interaction entre ces deux facteurs n'était pas significative ($F_{3,72} = 0,67$; $P = 0,57$).

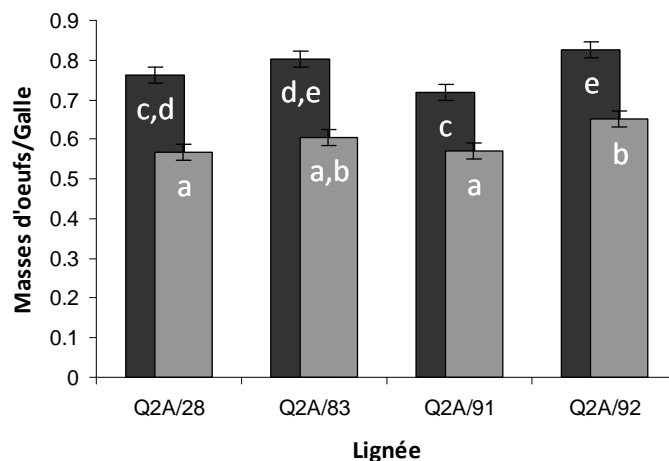


Figure 19. Le nombre de masses d'œufs par galle, après inoculation avec deux doses différentes de juvéniles de nématodes, pour 4 lignées recombinantes. Le nombre de masses d'œufs par galle est, en moyenne plus bas avec la plus forte dose de juvéniles de nématode (gris foncé, 123 ± 5 nématodes). Le nombre de masses d'œufs par galle varie également entre les lignées de plantes. Les barres qui portent les mêmes lettres blanches ne sont pas différentes à un seuil de significativité de 5%, selon de tests t de Student bilatéraux par paires de combinaisons.

En combinant les taux de réussite de l'infection, d'une part, et d'autre part la production d'œufs, des juvéniles de nématode ont eu un taux de reproduction d'environ 51% et 35%, respectivement, pour le faible et le plus fort dose de l'inoculum.

4.3. Discussion

En inoculant 45 accession d'*Arabidopsis* avec 7900 œufs/juvéniles de *M. hapla* par plante, Boiteux *et al.* (1999) ont rarement obtenus plus que 100 galles sur les systèmes racinaires entiers, et un maximum de 215 femelles par 100 mg tissue de racines à l'état humide naturel. Ces valeurs se traduisent à des taux d'environ 0,01 galles et d'environ 0,01 femelles par nématode inoculé, en supposant qu'une plante d'*Arabidopsis* aurait rendu d'environ 50 mg tissue racinaire dans les conditions de culture décrit par Boiteux *et al.* (1999). Sijmons *et al.* (1991), en inoculant 11 accessions d'*Arabidopsis* avec 70 juvéniles de nématodes à kyste *H. schachtii*, ont trouvé un maximum de 11 ($\pm 3,9$) femelles par plante dans leurs tests, ce qui se traduit à un taux d'infection d'environ 0,15 femelles par nématode inoculé. En comparaison avec les résultats mentionnés au-dessus, le succès d'infection obtenu dans nos expériences était bien supérieur. Cela suggère que les protocoles utilisés ici étaient mieux pour obtenir un bon taux d'infection d'*Arabidopsis* par *M. javanica*, parfois atteignant presque 90% des nématodes inoculés. De plus, les protocoles aboutissaient aussi à obtenir un taux de reproduction des femelles de *M. javanica* correct, parfois atteignant presque 70% des galles formées.

Les doses de nématodes inoculés dans cette expérience différaient d'un facteur d'environ 2. Le succès d'infection des nématodes inoculés était plus faible à la plus forte dose, et cette variation était hautement significative. Tels effets négatifs de la densité sont souvent observés pour l'interaction entre des parasites et leurs hôtes. D'un côté, plus des parasites infectant un hôte, les impacts négatives sur la fécondité et la survie de l'hôte sont plus fort (Anderson & May, 1978 ; Keymer, 1982). De l'autre côté, le fitness d'un parasite individuel est typiquement corrélé négativement avec le nombre des parasites qui envahissent l'hôte, soit à cause des réponses de défense de l'hôte, soit à cause d'une compétition entre les parasites pour des ressources limitées (Bradley, 1971 ; Anderson, 1976 ; Anderson & Michel, 1977 ; Anderson & May, 1978 ; Keymer, 1982 ; Michael & Bundy, 1989 ; Nie & Kennedy, 1993 ; Ashworth *et al.*, 1996 ; Ebert *et al.*, 2000 ; Walker *et al.*, 2009). Tels effets peuvent, au moins partiellement, expliquer pourquoi l'inoculation d'*Arabidopsis* avec un très grand nombre de nématodes, comme il est effectué par exemple dans les travaux de Boiteux *et al.* (1999), aboutait à un très faible taux d'infection.

De manière tout à fait surprenante, la dose de nématodes dans l'inoculum avait aussi un effet hautement significatif sur le nombre de masses d'œufs produits en moyenne par galle, visible 60 jour après l'inoculation sur l'ensemble des galles induites par ces nématodes. Quand les plantes étaient inoculées avec la plus forte dose de nématodes, plus de femelles étaient nécessaires pour aboutir au même nombre de masses d'œufs par système racinaire (voir **Figure 18**). Par exemple, à la faible dose de l'inoculum, 40 galles engendraient environs 30 masses d'œufs alors qu'à la plus forte dose, le même nombre des masses d'œufs, 30, était engendré par 52 galles. En conséquence, ils existent d'autres effets négatifs de la densité, mais cette fois-ci, ces sont des effets à longue durée. Cet effet négatif de la densité est aussi visible à travers la relation linéaire mais avec une pente inférieure à 1 entre la production de masses d'œufs dans le système racinaire de chaque plante et le nombre de galles trouvé. Plus le nombre de galles était important, moins d'œufs étaient produits par galle.

En fait, plusieurs études ont montré que le succès reproducteur des nématodes à galles se dépend probablement du nombre initial de nématodes inoculés. Ces études ont testé la relation entre le taux de reproduction et la nombre de nématodes dans l'inoculum pour l'interaction entre *M. javanica* et des pommes de terre (Vovlas *et al.*, 2005), et l'interaction entre *M. incognita* et l'épinard (Di Vito *et al.*, 2004) et l'aubergine (Di Vito *et al.*, 1986). Pour l'interaction entre *M. javanica* et les pommes de terre, le taux de reproduction était caractérisé par une courbe avec un optimum à une dose intermédiaire, augmentant d'abord avec une augmentation de la dose d'inoculum, mais diminuant à la dose le plus forte (Vovlas *et al.*, 2005). Le succès reproducteur des nématodes montre, donc, une dépendance positive de la densité à faible dose d'inoculum et une dépendance négative de la densité à grande quantité d'inoculum. Pour l'interaction entre *M. incognita* et l'épinard, la relation entre le taux de reproduction et la dose de l'inoculum variait, mais montrait, en générale, une dépendance négative de la densité (De Vito *et al.*, 2004). Finalement, pour l'interaction entre *M. incognita* et des aubergines, la relation entre le taux de reproduction et la dose de l'inoculum était strictement négative : plus la quantité de nématodes était grande dans l'inoculum, plus le taux de reproduction était faible (De Vito *et al.*, 1986).

Nous proposons deux types d'hypothèses pour expliquer les effets de la densité négatifs à longue durée. Peut être il y a des effets négatifs provoqués par des interactions compétitrices entre les juvéniles de nématode dans l'inoculum. Alternativement, un plus grand nombre des juvéniles de nématodes qui essaye d'infecter une plante déclenche plus efficacement des systèmes de défense de la plante, rendant la plante un moins bon hôte pour ces nématodes ultérieurement. Clairement, ces hypothèses ont encore besoin d'être vérifiées en réalisant d'autres expériences visant à tester le taux d'infection et la fécondité des nématodes sur une plus grande échelle de doses. Ces expériences doivent aussi cibler les réponses moléculaires d'*Arabidopsis* tels que les voies de signalisation par des phytohormones et les gènes qui sont régulés en réponse d'une infection par des nématodes phytoparasites.

Selon Trudgill (1986 ; 1991) la résistance d'une plante contre des nématodes phytoparasites est définie comme la capacité de la plante à limiter (ou à empêcher) la multiplication des nématodes phytoparasites. Selon cette définition, la variable qui est important pour décrire la résistance d'une plante contre des nématodes phytoparasites est le nombre d'œufs viables produits par une femelle de nématode qui attaque une plante. Pratiquement, ce n'est pas le nombre des œufs viables qui est compté, mais plutôt le nombre de masses d'œufs produits par les femelles de nématodes sur un système racinaire. Est-ce que le comptage de galles alors suffit pour estimer la résistance d'*Arabidopsis* contre les nématodes *M. javanica* ? Les résultats montrés auparavant (voir 3.2.) suggèrent que ce n'est pas seulement le nombre de galles qui est important. Il faut aussi faire attention à (i) la vitesse de développement de nématodes dans les plantes, indiquée par le début de formation de masses d'œufs ; (ii) le nombre de nématodes qui est présent dans une seule galle, indiqué en partie par la taille de la galle, mais aussi par le nombre de masses d'œufs sur cette galle ; (iii) la distribution des galles sur le système racinaire de la plante ; et finalement (iv) le taux de reproduction de nématodes. Tous ces facteurs (et probablement plus) varient entre les accessions d'*Arabidopsis*. De même, Boiteux *et al.* (1999) avaient identifié des accessions d'*Arabidopsis* qui supportent un très grand nombre de galles avec un très faible taux de fécondité de femelles par galle.

Cependant, le choix de la population RIL Da(1)-12 x Ei-2 pour la cartographie de QTL a été basé non seulement sur les différences en nombre de galles entre les accessions mais aussi en prenant en compte d'autres observations concernant la taille de galles, leur distribution, et le début de formation de masses d'œufs. Les quatre lignées recombinantes analysées dans cette partie sont les descendants d'un croisement entre deux RILs de cette population.

Pour ces quatre lignées, le nombre de masses d'œufs augmentait avec le nombre de galles sur les racines, mais avec une pente inférieure à 1, alors, montrant des effets négatifs de la densité. Mais pour une lignée, Q2A/92, la pente approchait 1 (**Figure 18**). Plus loin (voir 6.2.4.), il sera montré que les deux génotypes homozygotes D et E, qui ségrégaient dans l'intervalle recombiné de cette lignée, sont plutôt sensibles aux nématodes. Les trois autres lignées, par contre, semblent de ségréger un génotype plus résistant et un génotype plus sensible. Donc, l'évaluation de la résistance en comptant les galles mais pas les masses d'œufs sur cette lignée Q2A/92, comporte un risque à surestimer la résistance de ces plantes, car ces galles produisent beaucoup de masses d'œufs. Or, cette erreur sera conservatrice pour nos conclusions finales parce cette lignée était déjà classée d'être sensible basée sur le nombre de galles.

En conclusion, même si le nombre total de galles ne suffit probablement pas pour estimer tous les aspects de la résistance d'*Arabidopsis* contre *M. javanica*, cet indice fonctionne bien pour les travaux menés ici.

5. Cartographie de QTL de la résistance

5.1. Introduction

L'analyse de traits à effets quantitatifs (QTL) est une méthode statistique qui relie deux types de données, (i) les données phénotypiques, et (ii) les données génotypiques qui sont représentées par le génotypage des lignées d'une population de cartographie (Falconer & Mackay 1996; Kearsey, 1998; Lynch & Walsh, 1998). Cette analyse nous permet de lier des régions spécifiques de chromosomes au caractère de résistance évaluée par le nombre de galles formées sur les racines de chacune des lignées de la population RIL. Les buts de ce processus sont (i) d'estimer le nombre de locus qui contribuent à la résistance contre les nématodes phytoparasites, (ii) de localiser ces locus, et (iii) de déterminer s'il existe des interactions génétiques entre ces locus.

5.2. Résultats

Un échantillon de 162 lignées de la population RIL Da(1)-12 x Ei-2 (Pfalz *et al.*, 2007) a été utilisé pour la cartographie de QTL. Les marqueurs utilisés pour la cartographie de cette population, les séquences des amorces et leur génotype sont résumés dans le **Tableau 7**, recopié de Pfalz *et al.* (2007). Les lignées étant homozygotes à la suite de plus que 8 générations d'autofécondation pour stabiliser les RILs, seulement 1 plante par lignée a été utilisée, chacune inoculée avec 127,5 ($\pm 2,5$ SEM) juvéniles de nématodes. Il est attendu que la moitié des 162 lignées porte l'allèle d'un parent d'origine et le reste porte l'allèle de l'autre parent à chaque locus. Donc, chaque combinaison entre marqueur et génotype était répliquée en moyenne 80 fois dans la population RIL. Les pots avec les plantes ont été posés sur des soucoupes en plastique et distribués aléatoirement dans l'espace de culture. En plus, 8 répliquats d'un des parents originaux, Da(1)-12, ont été distribués dans le même espace afin de vérifier l'homogénéité des conditions environnementales et expérimentales.

Figure 20. Distribution de données dans l'expérience de la cartographie de QTL.

Les barres montrent les nombres de lignées en fonction de nombre de galles comptées sur leurs racines, avec une taille d'intervalle de 5. Le flèche rouge verticale indique le moyenne du nombre des galles de l'accension Da(1)-12 ($N = 8$ répliquats), ± 2 écart-types (flèche rouge horizontale).

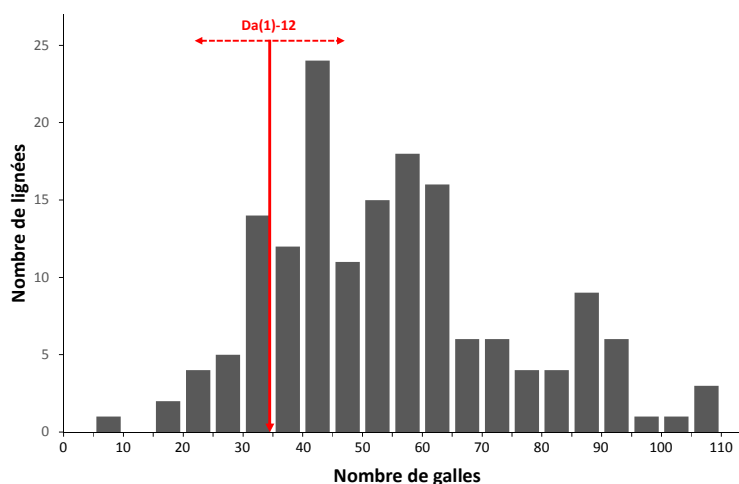


Tableau 7. Marqueurs utilisés pour la cartographie de QTL chez la population RIL Da(1)-12 x Ei-2. Le tableau montre les marqueurs, les chromosomes, les séquences des amorces pour les PCRs, ainsi que la différence de tailles de produits PCR entre les génotypes D et E. Le tableau a été reproduit après Pfalz et al. (2007).

Marqueur	Chr	Primer 1 (5'→3')	Primer 2 (5'→3')	Génotype
C1P12	1	CTGGAAGTCCATACCATGAG	GTTCTGCTGTCGTGGTATTG	D > E
F20D23_2	1	CCGTACACCAATTCACAATC	CCAACCCCTTATATATCGTTC	D > E
MSAT1.7	1	GCTTTTATCAGCTCAAAACAT	ACTCTTACGTTTGGAGTTCA	D > E
NGA248	1	TCTGTATCTCGGTGAATCTCC	TACCGAACCAAAACACAAGG	D < E
F1K23	1	GAACCAATAAGGAGGCTCAAC	CCATACGGAGAAACCTTCTTC	D > E
MSAT1.4	1	CTAACTAGAACCCAGGGGTAA	ACAAAAATCGTGGTGATAATA	D < E
T27K12	1	GGAGGCTATACGAATCTTGACA	GGACAACGCTCAAAACGGTT	D > E
B14	1	CCATTCTCGTCGTGTTATAAG	GAAATGTTAAGGCCAAAATACAG	D < E
B12	1	CAACTCGTTATAACAGGTTTTAC	CCAAATACTAAAGAGGGGAATTG	D < E
F5J14	1	CTGCCTGAAATTGTGCAAAAC	GGCATCACAGTTCTGATTCC	D > E
MSAT1.12	1	TTAGAGATTGCGCAACCTC	CGTGTGCCCAACCA	D > E
MSAT1.13	1	GTCAAACCAAGTTCAATCA	CAACCAACAGGCTC	D < E
MSAT1.1	1	ATACGATAAGATTATTAGCA	CCCATGCTCTTTTTGTGAAA	D > E
MSAT1.2	1	TTGAGTGGTGCCGCTTG	ATATCTCATCGCTGCAACC	D > E
MSAT2.18	2	TAGTCTCTTTTGGTGCGCATA	AGCCTCTCAAAGCTTAGGTCT	D > E
MSAT2.28	2	AATAGAAATGGAGTTCGACG	TGAACTTGTGTGAGCTTTG	D < E
MSAT2.11	2	GATTTAAAAGTCCGACCTA	CCAAAGAGTTGTGCAA	D > E
T20K24	2	CAATATTCGTGGGAGTTAGTC	GCTGTGCAATTACATTTCTTTAC	D < E
F3K23	2	CTCGCAGCGTCTCAAAATTC	GAAGCGGAAGTGGAGAGAC	D > E
MSAT2.37	2	GGTTGTTTCATCGAAAGCA	CATGGTCTCGCTGGTGTAT	D < E
MSAT2.4	2	TGGGTTTTGTGGGTC	GTATTATTGTGCTGCCTTTT	D < E
A21	2	CCATCTAACTGCTTACGATG	GTGACCCATTCTCTCTTTTT	D < E
MSAT2.22	2	CGATCCAATCGGTCTCTCT	TGGTAACATCCCGAACTTC	D < E
C3P41	3	GGTCGTATCCTCTTATCGAAC	CTTGTGAGTGGTCTTATGAAAG	D < E
c3FM08	3	GGTTCGTATCCAAAACCAAG	CCATCATTGGAGCAAGAGAC	D > E
C3P43	3	CAATGTTGGCTTGGAAATAATG	CATTGCCGGTAAAAATGTTTTTC	D > E
c3FM09	3	CTAATTACTATGGCGGAGAATTC	CTAAAGAAATCTCGCGTCTTC	D > E
c3FM10	3	CATTACTTCACTGTTGCTTTAC	GACAGGTTATGGCTTGTAAATC	D > E
MSAT3.19	3	TAATTGATCCAATTGACAT	TGGCTTGGCACAAC	D < E
c3FM12	3	TAGGGAAGCATTGTCTTGAG	TGCTTAAAGTGACGGTAAAAATG	D: 1 band E: 2 bands
MSAT3.8	3	ATGTTAAAAACCCGTGTTGG	TTTAACCTTATCCGGGAAAG	D > E
MSAT3.32	3	GCACTTGACGCTTAACCT	CGTGACTGTCAAACCG	D > E
C32	3	GAAGAGGATGAACAAAGATAAG	CAAATCTGCCTCTCCATAAG	D < E
C3P54	3	CCTTTCCATTGAGGAAACAAAC	CCGTATTCATCACAACCTTG	D > E
C3P58	3	CTGCTTATGGCAACAGAAC	GTTTCTCATACGCTGATGC	D > E
MSAT3.28	3	TACAAGTCATAATAGAGGC	GGGTTTAGCATTTAGC	D < E
F4C21	4	GCGCTTCATCTAGTTACGCTTT	CCCGGACTGAACCAAACTAA	D > E
NGA8	4	GAGGGCAAATCTTTATTTTCGG	TGGCTTTCGTTTATAAACATCC	D < E
F28M11	4	CACCATATTGGCCTCAAATTG	CAAAAAACCGTTCCACCAAC	D < E
MSAT4.25	4	GAATGGTGTGTGATAGTTGA	AAATTTCAGGAGGTGATAGA	D < E
MSAT4.35	4	CCCATGTCTCCGATGA	GGCGTTAAATTTGCATTCT	D < E
T6G15	4	GTAGCCAGAGATGGAAGTTAC	GGGTCTTACTGAGGCTTTG	D > E
MSAT4.18	4	TGTAATATCGGCTCTAAG	CTGAACAATAGCGCTATTA	D < E
T27E11	4	GTGATTCCCGTCTGCTAAAC	CCTCCTTCAGCATCATAGTG	D > E
F25O24	4	CAATGTATTGGATGTGTTTGTTT	GGATGTAACACGGCTAAAC	D < E
FM12	4	GAAGCCCTATGAGATGGTC	GTGAGGGAGTTAGGTAGCAAC	D < E
FM17	4	CTCCCTCTTCGAGAAATTC	CATCTCTTATAGGCTCTCTC	D > E
c4FM05	4	CTAACAGATTGGTGAATAACAAG	TCATTTGATGTGCCAGTAAATC	D > E
FM21	4	CTCAAGCGGTGGAATTTGGAG	GTAAGAATGTCCAGGGCAG	D < E
MSAT4.14	4	GACCGTTTCTAGTGCTCACA	ACGGAATAAGCGGAGGA	D < E
FM24	4	GAGCATCCGCTAGGTAAAG	CACAGAGAGACTCAAAAACTAG	D < E
c4FM01	4	AGTAGATACAATGCGTTGACC	GGAGCGTTAATAGTGTGTATG	D < E
MSAT4.9	4	GAAATCAACGGCTGAG	AAGTAATTAAGACGCTGAGA	D < E
F4B14	4	CGTCGTTTATTTACCAACCAC	GGTACAAAGATGGGTTAAACTG	D < E
MSAT4.33	4	TTCTTTGACACGCAAAACA	TGGTGACATAGACCAATG	D > E
MSAT4.21	4	TTATGCTATGGCTGTTTGGT	CGAAATCTGTTCTTGCAATC	D > E
MSAT4.30	4	AGAGCACTACCGTTTCAT	TGTGTTCTGGGATTTACC	D < E
MSAT4.31	4	AGGGATATGGATTGAGA	GCCGTATAACTATTGGTT	D < E
NGA249	5	TACCGTCAATTTTCATCGCC	GGATCCCTAAGCTGAAAAATCCC	D > E
NGA151	5	GTTTTGGGAAGTTTTGCTGG	CAGTCTAAAAGCGAGAGTATGATG	D < E
NGA139	5	GGTTTCGTTTCACTATCCAGG	AGAGTACCAGATCCGATGG	D > E
C5P71	5	GACGATGGTGGAGTGATAAG	CTTTGACCTCAAACTTAAGTAG	D < E
MSAT5.25	5	GCTTAATTTGGGTTAAAT	GCACGCAAGTGACT	D < E
MSAT5.22	5	AGAACAAGTTAGGTGGCT	GGGACAAGAAATGGAGT	D < E
C5P81	5	GTCAAAGAGTTACTCCGTTAC	CGAGACAAGAGCATGTTATATG	D < E
MIO24	5	GTACAATAATTTAGAGAGTATTTTG	CTAGCTCAACTTACTGCTTAATG	D < E
MNC6	5	GTTTGGGTCCAATGATAAAATC	GCCTATTGGGCTGAGTTTTT	D > E
MMN10	5	CAGTGTGCGTAAATTTTCGAC	CAGTCGACATTTCAAAGGTTT	D < E
c5FM10	5	GATTTGACGACTGATTACATAAC	GCTTGAAATTTGTGTGATTGTC	D > E
c5FM09	5	CAATTTCTGTATTCTGCTTATG	CCATTGCCATATGTTCCCTC	D < E

Tableau 8. Nombre de galles provoquées par les nématodes à galles *Meloidogyne javanica* sur les racines des lignées de la population RIL Da(1)-12 x Ei-2 utilisées pour la cartographie de QTL de résistance.

RIL	N _{galles}	RIL	N _{galles}	RIL	N _{galles}	RIL	N _{galles}	RIL	N _{galles}	RIL	N _{galles}		N _{galles}
DE001	78	DE034	45	DE064	61	DE101	59	DE133	89	DE168	34	Da	30
DE003	59	DE036	98	DE065	34	DE103	33	DE138	63	DE169	58	Da	35
DE005	30	DE037	59	DE066	87	DE104	41	DE139	36	DE170	44	Da	39
DE006	46	DE038	62	DE068	54	DE105	74	DE140	48	DE173	37	Da	33
DE009	41	DE039	59	DE069	45	DE106	8	DE141	34	DE174	65	Da	35
DE010	41	DE040	45	DE070	56	DE107	59	DE142	76	DE175	62	Da	29
DE011	38	DE041	44	DE071	57	DE108	45	DE143	61	DE181	38	Da	48
DE012	56	DE042	30	DE072	21	DE109	51	DE144	47	DE182	54	Da	38
DE013	69	DE043	21	DE073	60	DE111	47	DE145	72	DE184	43		
DE014	53	DE044	66	DE074	48	DE112	74	DE146	62	DE185	88		
DE015	63	DE045	108	DE076	42	DE113	81	DE147	38	DE186	44		
DE016	34	DE046	42	DE077	65	DE114	49	DE148	44	DE187	87		
DE017	38	DE047	33	DE078	83	DE116	34	DE149	42	DE188	51		
DE018	55	DE048	49	DE079	73	DE117	53	DE150	33	DE189	87		
DE019	91	DE049	94	DE080	77	DE118	45	DE152	31	DE191	56		
DE020	73	DE050	44	DE081	41	DE120	95	DE153	93	DE194	61		
DE021	56	DE051	89	DE085	63	DE121	48	DE154	86	DE195	51		
DE022	66	DE052	85	DE086	21	DE122	66	DE157	52	DE196	93		
DE023	43	DE053	65	DE087	21	DE123	34	DE158	61	DE197	57		
DE024	50	DE055	63	DE089	57	DE124	29	DE160	56	DE201	89		
DE026	101	DE056	36	DE090	54	DE125	51	DE161	32	DE203	63		
DE027	78	DE057	40	DE091	36	DE127	90	DE162	74	DE204	82		
DE028	45	DE058	47	DE092	66	DE128	45	DE163	107	DE205	27		
DE029	56	DE060	47	DE093	44	DE129	64	DE164	39	DE206	26		
DE030	32	DE061	109	DE095	47	DE130	31	DE165	39	DE208	19		
DE031	41	DE062	56	DE099	20	DE131	53	DE166	38	DE209	44		
DE032	31	DE063	54	DE100	51	DE132	68	DE167	56	DE211	53		

Le nombre de galles sur les racines des RIL variait de 8 à 109, avec une moyenne de 54,9 ($\pm 1,6$ SEM). Pour commencer, l'association entre le nombre de galles et les géotypes¹ (D ou E) a été testée pour tous les 68 marqueurs informatifs de la population Da(1)-12 x Ei-2 (Pfalz *et al.*, 2007) en utilisant 68 ANOVAs à un facteur. Quatre régions du génome ont été identifiées en tant qu'ayant des associations significatives entre le phénotype (nombre de galles) et le géotype (D *versus* E). Ces régions se trouvaient sur les chromosomes 2 à 5 d'*Arabidopsis*. Le **Tableau 9** résume les marqueurs associés à une différence en nombre de galles entre D et E, le soutien statistique pour cette différence, sa direction et la proportion de la variance du phénotype expliquée par le géotype.

¹ Par convention, un allèle ou géotype qui provient de l'accension Da(1)-12 d'*Arabidopsis* sera dénommé 'D' et un allèle ou géotype qui provient de l'accension Ei-2 d'*Arabidopsis* sera dénommé 'E', afin d'éviter de les confondre avec des accessions. La dénomination des accessions est gardé comme avant : Da(1)-12, Ei-2.

Tableau 9. Marqueurs associés à une différence en nombre de galles entre génotypes, selon d'ANOVA en utilisant la population RIL Da(1)-12 x Ei-2.

Marqueur	F	P	N _{Galles}	%variance expliquée
MSAT2.4	13.32	0.00036	D < E	7.82
MSAT3.19	6.15	0.01423	D < E	3.77
MSAT4.25	8.21	0.00473	D > E	4.91
C5P81	9.14	0.00292	D < E	5.50

Les marqueurs avec le plus haute soutien statistique dans ces régions ont été déterminés comme le suivant : MSAT2.4 sur le chromosome 2 ($F_{1,159} = 13,32$; $P < 0,001$), MSAT3.19 sur le chromosome 3 ($F_{1,157} = 6,15$; $P < 0,05$), MSAT4.25 sur le chromosome 4 ($F_{1,159} = 8,21$; $P < 0,01$), et C5P81 sur le chromosome 5 ($F_{1,157} = 9,14$; $P < 0,01$). Au niveau de trois de ces marqueurs, MSAT2.4, MSAT3.19, et C5P81 les plantes portant le génotype D ont eu moins de galles, alors qu'au marqueur MSAT4.25 les plantes portant le génotype D ont eu plus de galles. En ces analyses, les génotypes au niveau de ces quatre marqueurs expliquaient 7,8% (MSAT2.4), 3,8% (MSAT3.19), 4,9% (MSAT4.25), et 5,5% de la variance de données. Cependant, le même test statistique a été conduit à 68 marqueurs. Après la correction pour des tests multiples selon Benjamini & Hochberg (1985), en permettant un taux de fausses découvertes (en anglais : false discovery rate, FDR) de 0,1, seule les marqueurs MSAT2.4 et C5P81 restaient significatives.

Pour explorer les effets majeurs et les possibles interactions ou les effets épistatiques des 4 QTLs putatifs, une ANOVA factorielle à quatre facteurs a été effectué. Le nombre de galles différait entre les génotypes D et E à tous les quatre marqueurs ; MSAT2.4 : $F_{1,139} = 22,00$; $P < 0,00001$; MSAT3.19 : $F_{1,139} = 7,22$; $P < 0,01$; MSAT4.25 : $F_{1,139} = 16,22$; $P < 0,0001$; C5P81 : $F_{1,139} = 7,51$; $P < 0,01$. En plus, il y avait une faible indication pour des interactions épistatiques entre les génotypes aux marqueurs MSAT2.4 et MSAT4.25 ($F_{1,139} = 3,12$; $P = 0,08$), MSAT3.19 et C5P81 ($F_{1,139} = 3,78$; $P = 0,054$), et MSAT3.19, MSAT4.25 et C5P81 ($F_{1,139} = 4,29$; $P < 0,05$). Ce modèle expliquait 30,7% de la variance des données. Dans ce modèle, les plantes portant le génotype D au marqueur MSAT2.4 ont eu d'environ 21% moins de galles que les plantes portant le génotype E. De même, les plantes portant le génotype D au marqueur MSAT3.19 ou C5P81 ont eu d'environ 13% moins de galles. Par contre, les plantes portant le génotype D au marqueur MSAT4.25 ont eu d'environ 23% plus de galles.

Tableau 10. Nombre de galles de *Meloidogyne javanica* sur les racines d'*Arabidopsis* aux 10 combinaisons de génotypes aux 4 marqueurs MSAT2.4, MSAT3.19, MSAT4.25 et C5P81 et l'accession parentale Da(1)-12. N indique le nombre de plantes observées par combinaison de génotype.

	MSAT2.4	MSAT3.19	MSAT4.25	C5P81	Gamme	Moyenne	SEM	N
Da(1)-12	D	D	D	D	29 - 48	35.9	2.1	8
RILs	D	D	D	D	21 - 86	42.8	5.0	12
RILs	E	D	D	D	33 - 66	51.8	2.8	12
RILs	D	E	D	D	31 - 95	55.4	5.6	13
RILs	D	D	E	D	34 - 88	47.4	4.1	12
RILs	D	D	D	E	32 - 109	57.5	6.7	11
RILs	E	E	E	E	51 - 98	64.9	5.5	8
RILs	D	E	E	E	27 - 65	49.3	4.1	10
RILs	E	D	E	E	44 - 87	59.2	7.9	5
RILs	E	E	D	E	42 - 108	75.4	9.2	8
RILs	E	E	E	D	36 - 83	53.8	5.3	9

Finalement, nous avons comparé les 12 RILs qui portaient le génotype D à tous les quatre marqueurs, MSAT2.4, MSAT3.19, MSAT4.25 et C5P81, avec la lignée parentale Da(1)-12. Le nombre de galles sur les racines de RILs variait entre 21 et 86, avec une moyenne de 42,8 ($\pm 5,0$ SEM). Le nombre de galles sur les 8 répliquats de l'accession Da(1)-12 variait entre 29 et 48, avec une moyenne de 35,9 ($\pm 2,1$ SEM). Selon un teste *t* de Student bilatérale, les moyennes n'étaient pas significativement différentes ($t = 1,07$; $df = 18$; $P = 0,30$). Le **Tableau 10** montre les gammes des nombres de galles, les moyennes, et les erreur-types (SEM) des différentes combinaisons de génotypes aux marqueurs MSAT2.4, MSAT3.19, MSAT4.25 et C5P81.

Notre ANOVA, décrit au-dessus, a démontré une relation entre le génotype et le phénotype, suggérant l'existence d'un certain nombre de QTL associé à la résistance d'*Arabidopsis* contre les nématodes *M. javanica*. Pour confirmer et formaliser ce résultat, nous avons utilisé des logiciels de la cartographie de QTL Avec WinQTL cartographer, jusqu'à 4 QTL potentiels qui contrôlent la variation de nombre de galles provoquées par *M. javanica* sur les racines d'*Arabidopsis* ont été détectés, en se basant sur les marqueurs de la population RIL Da(1)-12 x Ei-2 (Pfalz *et al.*, 2007 ; **Tableau 7**) et en utilisant la cartographie d'intervalle composite (CIM). Ces QTL ont été réparties sur 4 des chromosomes d'*Arabidopsis*, et associés avec les mêmes marqueurs qui ont été identifiés précédemment en utilisant une analyse marqueur-par-marqueur : MSAT2.4, MSAT3.19, MSAT4.25, et C5P81. Les QTL ont été nommés selon les chromosomes où ils étaient localisés : QTL2, 3, 4 et 5 se trouvaient sur les chromosomes 2, 3, 4, et 5, respectivement (**Figure 21**). Cependant, la position des QTL et leur soutien statistique peuvent dépendre du modèle utilisé pour leur estimation. Pour vérifier la stabilité des résultats, plusieurs combinaisons de paramètres de contrôle ont été testées, en modifiant le nombre de marqueurs du fond et la taille de la fenêtre considérée. De même, deux méthodes de régression ont été testées, « forward » en ajoutant des

variables et « backward » en les enlevant d'un modèle complet (Wang *et al.*, 2012b). Pour chaque combinaison de paramètres, le seuil de significativité a été déterminé par 1000 permutations des données. Le seuil de significativité était toujours proche d'un LOD de 2,5. Le **Tableau 11** montre les résultats de ces modifications de paramètres de contrôle pour le 4 QTL potentiels.

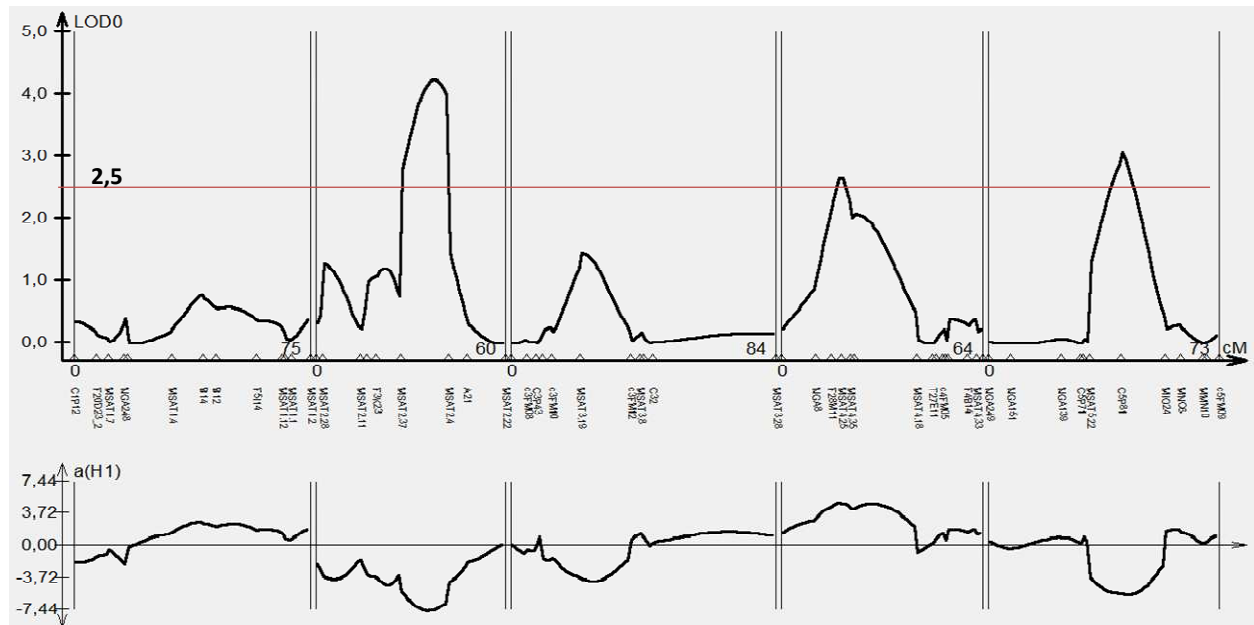


Tableau 11. Les paramètres de contrôle pour le modèle standard de la cartographie d'intervalle composite en différentes combinaisons et leurs effets sur la significativité des QTL.

QTL	Paramètres de contrôle			Position par cM	LOD
	Nombre de Marqueurs	Taille de la fenêtre	Méthode de la régression		
Chromosome II	5	10	Forward	38.5	4.25
	10	10	Backward	38.5	5.4
	10	2	Backward	38.5	5.4
	8	8	Forward	38.5	5.4
	8	8	Backward	38.5	4.6
Chromosome III	5	10	Forward	24.5	1.5
	10	10	Backward	24.5	2
	10	2	Backward	24.5	2.3
	8	8	Forward	21.9	1.8
	8	8	Backward	22.7	1.9
Chromosome IV	5	10	Forward	18.7	2.6
	10	10	Backward	18.7	2.3
	10	2	Backward	15.5	2.25
	8	8	Forward	17.2	2.7
	8	8	Backward	17.2	2.2
Chromosome V	5	10	Forward	45.2	3.1
	10	10	Backward	45.2	2.5
	10	2	Backward	45.2	2.6
	8	8	Forward	44	2.7
	8	8	Backward	42	2.4

Le QTL2 dépassait toujours le seuil de significativité, avec des LOD scores jusqu'à 5,4. Le QTL3 n'atteignait jamais le seuil de significativité, alors que le degré de significativité de QTL4 et de QTL5 dépendait des paramètres choisis pour l'analyse (**Tableau 11**). L'estimation de la position de QTL2 était stable, les autres variaient par quelques centiMorgans selon les paramètres de l'analyse. Les effets génétiques additifs de l'ensemble des 4 QTL potentiels expliquaient d'environ 22% de la variation phénotypique dans l'expérience. Le QTL2 lui seul expliquait près de la moitié de cette variation génétique. Comme nous avons déjà décrit précédemment, les génotypes D réduisaient le nombre des galles sur les racines chez les QTL2, 3 et 5, alors que chez le QTL4, c'était le génotype E qui réduisait le nombre de galles.

Le logiciel R/qtl (Broman *et al.*, 2003) a été utilisé pour faire un scan bidimensionnel du génome d'*Arabidopsis* avec une modèle deux-QTL, en utilisant la régression selon Haley-Knott (Haley & Knott, 1992) pour estimer les positions de QTL, et en utilisant la méthode des imputations multiples pour estimer l'intensité de leurs effets.

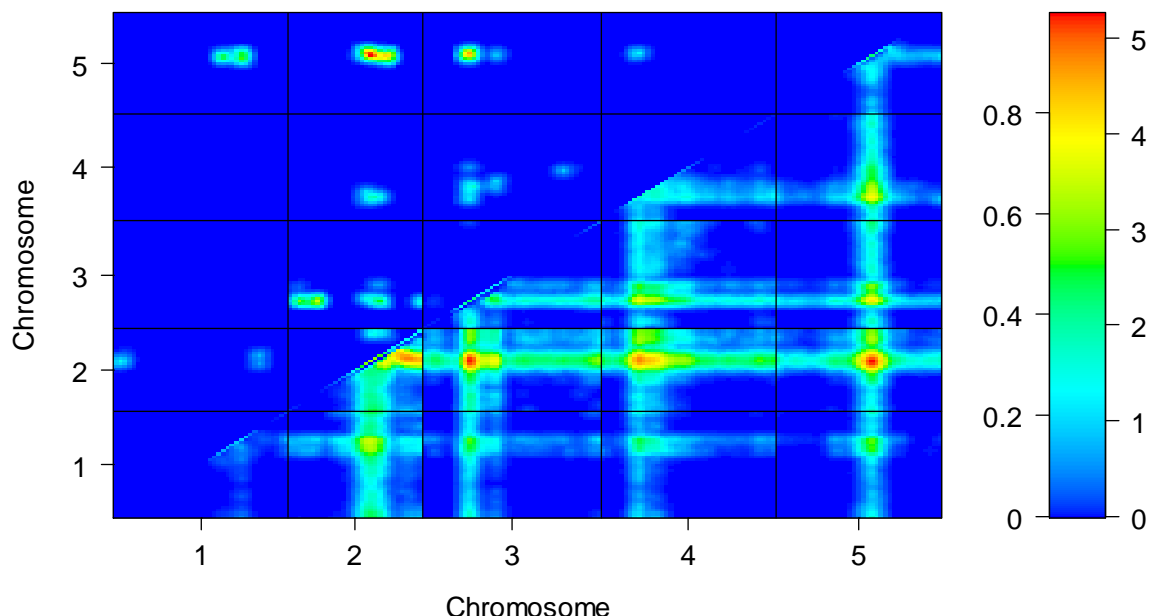


Figure 22. Scan bidimensionnel du génome d'*Arabidopsis* en utilisant R/qtl. Le scan montre l'interaction épistatique (au dessus du diagonal) et les effets conjoints (en dessous du diagonal) en utilisant R/qtl. Les Facteurs de Bayes (2logBF) pour les interactions épistatiques sont tracés en utilisant l'échelle sur la gauche de l'échelle couleurs, et les scores d'effets conjoints sont tracés en utilisant l'échelle sur la droite.

Le **Figure 22** montre les résultats du scan bidimensionnel du génome d'*Arabidopsis*. Le support pour les interactions épistatiques était très faible, suggérant que ces interactions étaient négligeables. Le scan soutenait la présence des 4 QTL identifiés préalablement, réparties sur les chromosomes 2 – 5, mais suggérait en plus la présence de deux QTL supplémentaires en proximité des QTL déjà postulés. Le premier QTL supplémentaire se trouvait à l'extrémité 'droite' du chromosome 2, et le deuxième QTL supplémentaire se trouvait entre QTL3 et le centre du chromosome 3.

L'existence de ces 2 QTL supplémentaires a été testée avec R/qtl, en utilisant la méthode des multiples imputations. Six modèles ont été testés ; ces modèles se différencient entre eux par la présence ou l'absence des QTL supplémentaires. Le premier modèle testait la présence des 4 QTL identifiés préalablement. Le deuxième modèle incluait le QTL supplémentaire sur chromosome 2. Le troisième modèle incluait le QTL supplémentaire sur le chromosome 3. Le quatrième modèle incluait les deux QTL supplémentaires distribués l'un sur le chromosome 2 et l'autre sur le chromosome 3. Le cinquième modèle testait l'absence de QTL sur chromosome 3, en incluant la présence d'un QTL supplémentaire sur chromosome 2. Finalement, un sixième modèle testait l'absence des QTL supplémentaires et du QTL3. Le **Tableau 12** résume les résultats de ces analyses.

Tableau 12. Des modèles pour tester l'existence des QTL supplémentaires sur les chromosomes 2 et 3 en utilisant la méthode des imputations multiples implémentée en R/qtl. Le tableau montre le soutien statistique (LOD, *P*) pour les modèles 1 – 6, le pourcentage de la variance phénotypique expliquée par le modèle (%var), et les degrés de liberté (*df*). Pour chaque modèle, les informations pour chaque QTL sont aussi présentées : les chromosomes et les positions² en cM des QTL, la variance phénotypique expliquée par QTL (%var), et le soutien statistique (LOD, *F*, *P*) pour l'existence du QTL donné. La significativité des modèles a été testée en comparant le modèle avec tous les QTL inclus dans ce modèle avec un modèle sans aucun QTL. QTL2supp et QTL3supp indiquent les QTL supplémentaires potentiels sur les chromosomes 2 et 3.

Modèle	Chromosome	QTL	Position [cM]	LOD	%var	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>P</i>
1				8.7	21.7		4, 158	7.09E-08
	2	QTL2	42.0	4.0	9.3	18.9	1, 158	2.51E-05
	3	QTL3	24.0	1.5	3.4	6.8	1, 158	1.01E-02
	4	QTL4	20.0	2.4	5.4	11.0	1, 158	1.15E-03
	5	QTL5	45.3	2.4	5.6	11.3	1, 158	9.82E-04
2				9.6	23.7		5, 157	3.79E-08
	2	QTL2	42.0	4.6	10.5	21.6	1, 157	7.07E-06
	2	QTL2supp	60.0	0.9	2.0	4.1	1, 157	4.39E-02
	3	QTL3	24.0	1.2	2.7	5.6	1, 157	1.87E-02
	4	QTL4	20.0	2.5	5.6	11.6	1, 157	8.30E-04
3				8.8	22.1		5, 157	1.86E-07
	2	QTL2	42.0	4.0	9.2	18.6	1, 157	2.79E-05
	3	QTL3	24.0	0.9	1.9	3.9	1, 157	5.01E-02
	3	QTL3supp	34.0	0.2	0.3	0.7	1, 157	4.07E-01
	4	QTL4	20.0	2.2	5.0	10.1	1, 157	1.82E-03
4				9.8	24.1		6, 156	9.02E-08
	2	QTL2	42.0	4.6	10.5	21.7	1, 156	6.88E-06
	2	QTL2supp	60.0	0.9	2.0	4.2	1, 156	4.30E-02
	3	QTL3	24.0	0.9	1.9	3.8	1, 156	5.20E-02
	3	QTL3supp	34.0	0.2	0.4	0.7	1, 156	3.88E-01
5				8.3	21		4, 158	1.44E-07
	2	QTL2	42.0	4.6	10.8	21.7	1, 158	6.78E-06
	2	QTL2supp	60.0	1.2	2.6	5.2	1, 158	2.34E-02
	4	QTL4	20.0	2.3	5.4	10.8	1, 158	1.23E-03
	5	QTL5	45.3	2.5	5.8	11.5	1, 158	8.62E-04
6				7.2	18.4		3, 159	4.33E-07
	2	QTL2	42.0	3.6	8.69	16.9	1, 159	6.21E-05
	4	QTL4	20.0	2.2	5.28	10.3	1, 159	1.62E-03
	5	QTL5	45.3	2.5	6.08	11.9	1, 159	7.38E-04

L'ensemble des modèles indiquait un fort soutien statistique pour la présence des QTL qui influaient le nombre de galles provoquées par *M. javanica* sur les racines d'*Arabidopsis*. Le pourcentage de la variation expliquée par les modèles variait entre 18 et 24% ; les modèles avec un plus grand nombre de paramètres tendaient à expliquer plus de la variation. Dans tous les modèles, le QTL2 avait la plus grande importance ; ce QTL expliquait la moitié de la variation génétique. QTL4 et QTL5 chacun expliquaient environ un quart de la variation génétique. L'importance de QTL3 était plus faible ; ce QTL expliquait au maximum 16% de la variation génétique. Le soutien statistique pour la présence des QTL supplémentaires sur les chromosomes 2 et 3 restait très faible ; le soutien pour la présence d'un QTL supplémentaire sur

² Notez que les positions des QTL ne correspondaient pas entièrement à ceux identifiées par WinQTLcart. Il s'agit d'un artefact causé par les logiciels pendant le calcul de la carte génétique du génome.

chromosome 2 dépassait juste, et le QTL supplémentaire sur chromosome 3 n'est dépassait jamais le seuil de significativité de 0,05. Ces résultats suggèrent que les QTL supplémentaires sont négligeables pour les analyses suivantes.

5.3. Discussion

Quatre QTL putatifs qui contribuent à la variation en nombre de galles provoquées par *Meloidogyne javanica* sur les racines d'*Arabidopsis* ont été détectés. Chacun de ces QTL est situé sur un chromosome unique et le QTL sur le chromosome 2 était le plus significatif avec l'effet le plus important. Pour 3 des 4 QTL détectés, les allèles D, venant du parent Da(1)-12, diminuent le nombre de galles sur les racines. Ces résultats sont conformes avec les analyses de la variation génétique naturelle entre des accessions d'*Arabidopsis* (voir 3.2.), qui ont montré que l'accension Da(1)-12 est plus résistant contre les nématodes que l'accension Ei-2.

Les effets additifs génétiques des génotypes à l'ensemble des 4 QTL putatifs expliquent d'environ 20% de la variation phénotypique observée dans l'expérience. Ce pourcentage n'est pas très fort en comparaison avec des études de QTL responsables de la résistance contre des autres parasites comme le ravageur *Pieris brassicae* (Pfalz *et al.*, 2007) ou les agents phytopathogènes *Erysiphe cichoracearum* (Rant *et al.*, 2013) et *Pseudomonas syringiae* (Wilson *et al.*, 2001) chez *Arabidopsis*. Dans ces études, les QTL identifiés expliquaient jusqu'à 48,4%, 50% et 63% de la variation phénotypique totale. Ces études ont été menées avec un nombre plus grand des réplicats, entre 10 et 50 plantes par RIL, ce qui permet une meilleure estimation des valeurs phénotypiques pour chaque lignée. Dans la présente étude 162 RILs, chacune avec une seule plante, ont été utilisées. L'absence de réplicats par RIL ne permet pas l'estimation des intervalles de confiance autour des valeurs phénotypiques estimées pour chaque RIL. Néanmoins, on peut avoir confiance dans nos estimations. Dans notre expérience nous avons inclus 8 réplicat de la lignée parentale Da(1)-12, et les nombres de galles trouvés sur les racines de ces 8 plantes étaient très semblables ($35,9 \pm 2,13$ SEM).

Wang *et al.* (2012a) décrivent un très grand nombre de QTL impliqués dans la résistance chez le coton contre *M. incognita*. En utilisant une population de 138 lignées recombinantes de coton, issue d'un croisement entre les deux espèces *Gossypium hirsutum* et *G. barbadense*, en 2 expériences à 5 réplicats par lignée, ils avaient identifiés 4 QTL majeurs avec un effet sur la sévérité de la formation des galles sur les racines et 2 QTL majeurs avec un effet sur la fécondité des femelles de nématodes. Chacun de QTL majeurs expliquait d'environ 10% de la variance phénotypique. En plus, ils avaient identifiés 19 et 15 QTL supplémentaires, respectivement, pour ces deux caractères, chacun expliquant d'environ 5% de la variance phénotypique. Par contre, Xu *et al.* (2013), en utilisant 246 lignées d'une population RIL de soja à 4 réplicats

par lignée, ont trouvés 3 QTL de résistance contre *M. incognita*, expliquant 5,6%, 7,4% et 23,6%, respectivement, de la variation phénotypique.

La cartographie de QTL chez *Arabidopsis* trouve aussi des QTL qui expliquent, tous ensemble, peu de la variation phénotypique, malgré un nombre élevé des réplicats. Par exemple, Lisec *et al.* (2008) ont utilisés 429 lignées recombinantes d'*Arabidopsis* avec 3 réplicats à 6 plantes par lignée pour identifier des QTL pour l'accumulation de la biomasse ; ensemble, les 6 QTL identifiés expliquaient seulement 18% de la variation phénotypique. De même, Pfalz *et al.* (2007) ont eu peu de succès d'identifier des QTL pour la résistance contre le ravageur *Plutella xylostella*. Malgré le phénotypage de plus de 2400 plantes de la population RIL Da(1)-12 x Ei-2 et même si la résistance contre ce ravageur variait significativement entre des accessions d'*Arabidopsis*, il n'y avait qu'une très faible indication pour un seul QTL. Ces études suggèrent que l'architecture génétique sous-jacente au caractère de résistance elle-même chez l'*Arabidopsis* est la responsable du faible taux de variance phénotypique expliquée dans l'expérience. Malgré la différence importante entre les deux accessions parentales, nous arrivons, par notre approche, à expliquer seulement une faible proportion de cette variation. C'est possible que le caractère de résistance soit influencé par un très grand nombre de QTL à très petits effet qui échapperaient des analyses de QTL standards et seraient visible seulement avec une approche à comble très fin (Kroymann *et al.*, 2005). Néanmoins, l'étude montre que la résistance d'*Arabidopsis* contre les nématodes à galles est un caractère à effet quantitatif, et la présente étude est la première à détecter des QTL qui contribuent à la résistance d'*Arabidopsis* contre *M. javanica*, au moins en ce qui concerne le nombre de galles.

6. Confirmation du QTL2 et cartographie fine

6.1. Introduction

Depuis plusieurs années, c'est presque impossible de publier une étude de la cartographie de QTL en utilisant une population RIL d'*Arabidopsis*, sans qu'au moins un des QTL détectés soit confirmé indépendamment dans une deuxième population de cartographie (Juergen Kroymann, communication personnelle ; Maarten Koornneef, communication personnelle). C'est pourquoi, au lieu de répéter l'étape de la cartographie de QTL une deuxième fois en utilisant Da(1)-12 x Ei-2, nous avons décidé de progresser directement à l'étape de la cartographie fine d'un des QTL.

La cartographie de QTL basée sur la population RIL Da(1)-12 x Ei-2 a permis d'identifier 4 candidats QTL potentiels de résistance contre les nématodes à galles *M. javanica*. Le QTL avec l'effet le plus important est celui porté par le chromosome 2, dénommé QTL2. Pour confirmer l'existence réelle de ce QTL et pour affiner sa cartographie, une population de cartographie fine a été générée, en croisant deux lignées appropriées de la même population RIL Da(1)-12 x Ei-2 (Pfalz *et al.*, 2007). La stratégie de la cartographie fine d'un QTL visait à isoler les effets phénotypiques d'un QTL des effets d'autres QTL identifiés et des effets du fond génétique, qui peuvent être causés par un nombre inconnu de QTL à effet mineur. Dans ce but, on croise des lignées pour obtenir des descendants issus de ce croisement qui sont ségrégués au niveau de QTL ciblé et identiques génétiquement autant que possible hors la région de ce QTL.

6.2. Résultats

6.2.1. Génération d'une population pour la cartographie fine

La population RIL Da(1)-12 x Ei-2 étant déjà génotypée (Pfalz *et al.*, 2007), c'était possible de choisir des lignées quasi isogéniques pour constituer une population permettant la cartographie fine du QTL2. Trois lignées DE004, DE022 et DE073 ont été sélectionnées pour faire deux types de croisements ; DE004 x DE073 et DE022 x DE073. Les trois lignées sont génétiquement identiques aux autres QTL potentiels postulés sur chromosomes 3, 4 et 5. Dans la région candidate du QTL2, les lignées DE004 et DE022 portent le génotype E et la lignée DE073 porte le génotype D. Malheureusement, les graines de la lignée DE004 n'ont pas germées, donc uniquement le croisement entre DE022 et DE073 a pu être effectué. Le croisement entre DE004 et DE073 aurait été préférable, parce que ces deux lignées partagent le génotype D au niveau du premier tiers du chromosome 2, entre marqueurs Msat2.38 et F3K23, alors que la lignée DE022 porte le génotype E à tous marqueurs du chromosome. Le génotypage des plantes F1 réalisé en utilisant le marqueur Msat3.28 a permis de confirmer le succès du croisement. Le **Figure 23** montre le génotype des plantes F1 issues du croisement entre DE022 et DE073.

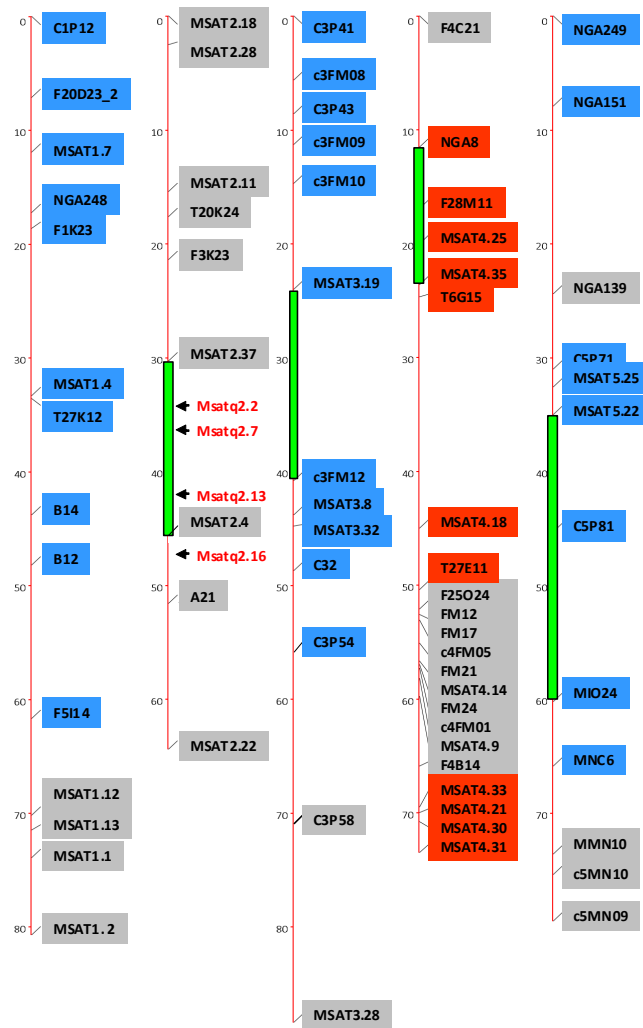


Figure 23. Carte génétique des plantes F1 issues du croisement entre RILs DE022 et DE073. La carte montre les cinq chromosomes d'Arabidopsis, des marqueurs génétiques avec leurs positions en centiMorgan (cM), ainsi que les régions candidates de QTL (barres vertes). Les marqueurs en police noire ont été utilisés pour la cartographie de QTL. Ces marqueurs ainsi que les génotypes de la population Da(1)-12 x Ei-2 sont décrits par Pfalz *et al.* (2007). Les marqueurs surlignés en rouge sont homozygotes D dans les deux lignées parentales du croisement, DE022 et DE073. De même, les marqueurs surlignés en bleu sont homozygotes E dans les deux lignées parentales, DE022 et DE073. En conséquence, les plantes F1 issues du croisement entre DE022 et DE073 et leur descendance (incluant les lignées recombinées utilisés ensuite, voir 6.2.4.) sont génétiquement identiques à ces loci. Par contre, les RILs DE022 et DE073 ont des génotypes différents aux marqueurs surlignés en gris. En conséquence, ces loci sont hétérozygotes dans la F1, et ils ségrègent selon les lois de Mendel dans la F2. Notez que la F1 issue du croisement entre DE022 et DE073 est hétérozygote dans l'intervalle candidate du QTL2, mais homozygote dans les intervalles candidates des autres QTL potentiels. Finalement, les marqueurs en police rouge ont servi pour la cartographie fine du QTL2.

6.2.2. Identification des recombinants dans la génération F2 pour la cartographie fine de QTL2

Dans la descendance de DE022 x DE073, les génotypes parentaux ont recombiné par le jeu de l'enjambement et ségrégué selon les lois de Mendel. L'intervalle candidate du QTL2 est situé sur le

chromosome 2 entre les marqueurs Msat2.37 à gauche, à 11,3 Mb de l'extrémité gauche du chromosome, et Msat2.4 à droite, à 13,8 Mb (Pfalz *et al.*, 2007). La distance génétique entre ces marqueurs a été estimée à environ 15 cM. Afin d'arriver à une résolution de 0,25 – 0,50 cM, des graines d'une unique plante F1 issue du croisement DE022 x DE073 ont été semées sur terreau stérilisé. Cent-quatre-vingt-douze plantes issues de ces graines ont été génotypées avec les marqueurs flanquants Msat2.37 et Msatq2.16, pour identifier des lignées recombinantes. Le marqueur Msatq2.16 est localisé environ 1,5 cM à droite du marqueur Msat2.4. Ensuite, ces plantes ont aussi été génotypées aux marqueurs Msatq2.2, Msatq2.7 et Msatq2.13, localisés dans l'intervalle entre les marqueurs Msat2.37 et Msatq2.16 (**Tableau 13**).

Tableau 13. Marqueurs moléculaires utilisés en cartographie fine de QTL2. Les marqueurs Msatq2.2, Msatq2.7, Msatq2.13 et Msatq2.16 ont été développés pour la cartographie fine de QTL2. Au début, 20 marqueurs microsatellites potentiels répartis sur l'ensemble de la région candidate ont été testés, et ces 4 marqueurs ont été validés comme étant polymorphiques entre les accessions d'*Arabidopsis* Da(1)-12 et Ei-2. Le tableau indique la localisation des amorces sens et anti-sens dans l'accèsion de référence Col-0 (Position) et leurs séquences. De même, la taille est celle du produit PCR chez Col-0. Il est aussi indiqué la relation de tailles de produits PCR pour les génotypes D et E. 'Hybridization' correspond à la température d'hybridation pendant la PCR.

Marqueur	Position	Amorce F 5'→3'	Amorce R 5'→3'	Taille [bp]	Hybridization [°C]
Msatq2.2	11940208	GTAACCAATAGCTTGCTGAAAC	CTGAAACATAACATGACAGTCAG	231; D > E	58
Msatq2.7	12404734	GCTATCCATCTCTATCATGTG	CCAAGATAATGTAAGTCTGTTTC	268; D < E	57
Msatq2.13	13615209	CATGCCTTCTCTGTAACATTG	CCTCTTAGATTTGTGATTCTCAC	223; D > E	57
Msatq2.16	14155470	GAGCTCGATTTGAGATATGG	GGAGAGAGATATATGAGCAAG	218; D < E	54

Le **Tableau 14** montre les résultats de génotypage de 196 plantes F2 issue d'un croisement entre les lignées RIL DE022 et DE073. Sur 176 plantes dont les résultats étaient exploitables, 125 plantes portaient le même génotype sur les deux marqueurs, 13 plantes étaient homozygotes sur les deux marqueurs mais avec différents génotypes parentaux à gauche et à droite, et 38 plantes étaient homozygotes à un marqueur et hétérozygotes à l'autre. Ces dernières plantes étaient les plus intéressantes car elles devraient présenter la plus forte probabilité d'une seule recombinaison dans la région candidate. Huit de ces plantes étaient D et 7 étaient E au marqueur Msat2.37, et 9 et 14 étaient D et E, respectivement, au marqueur Msatq2.16.

Tableau 14. Génotypage initiale des 196 plantes F2 issues du croisement DE022 x DE073. Ces plantes ont été génotypées avec les cinq marqueurs MSAT2.37, Msatq2.2, Msatq2.7, Msatq2.13 et Msatq2.16 pour identifier des recombinantes dans l'intervalle candidat du QTL2. D : la plante porte le génotype D homozygote au marqueur, E : la plante porte le génotype E homozygote au marqueur, H : la plante est hétérozygote au marqueur, x : le résultat de la PCR n'était pas exploitable.

Plante F2	Msat2.37	Msatq2.2	Msatq2.7	Msatq2.13	Msatq2.16	exploitable?
Q2A/1	H	H	H	H	H	oui
Q2A/2	H	H	H	H	H	oui
Q2A/3	D	D	H	H	H	oui
Q2A/4	H	H	H	H	H	oui
Q2A/5	H	H	H	D	D	oui
Q2A/6	H	H	H	H	H	oui
Q2A/7	H	H	H	H	H	oui
Q2A/8	E	E	E	E	E	oui
Q2A/9	H	H	H	D	H	oui
Q2A/10	E	E	E	E	E	oui
Q2A/11	E	E	E	E	E	oui
Q2A/12	H	H	H	H	H	oui
Q2A/13	E	E	E	D	D	oui
Q2A/14	E	E	E	D	D	oui
Q2A/15	x	x	x	x	x	non
Q2A/16	E	E	E	E	E	oui
Q2A/17	D	D	D	D	D	oui
Q2A/18	H	H	H	H	H	oui
Q2A/19	x	x	x	x	x	non
Q2A/20	D	D	D	D	D	oui
Q2A/21	D	D	D	D	D	oui
Q2A/22	D	D	D	D	D	oui
Q2A/23	E	E	D	E	E	oui
Q2A/24	E	E	E	E	E	oui
Q2A/25	E	x	x	x	x	non
Q2A/26	H	H	H	H	H	oui
Q2A/27	H	H	H	H	H	oui
Q2A/28	H	H	E	E	E	oui
Q2A/29	E	E	E	E	E	oui
Q2A/30	H	H	H	H	H	oui
Q2A/31	H	H	E	E	E	oui
Q2A/32	H	H	x	H	H	oui
Q2A/33	x	D	x	E	H	non
Q2A/34	H	x	x	x	E	oui
Q2A/35	H	H	H	D	H	oui
Q2A/36	E	E	E	E	E	oui
Q2A/37	H	H	H	H	H	oui
Q2A/38	H	H	D	D	D	oui
Q2A/39	H	E	E	E	E	oui
Q2A/40	H	H	H	H	H	oui
Q2A/41	D	x	D	D	D	oui
Q2A/42	H	H	H	H	H	oui
Q2A/43	H	H	E	E	E	oui
Q2A/44	H	H	H	H	H	oui
Q2A/45	H	H	H	H	H	oui
Q2A/46	E	E	E	D	D	oui
Q2A/47	H	H	H	E	H	oui
Q2A/48	D	D	D	D	D	oui
Plante F2	Msat2.37	Msatq2.2	Msatq2.7	Msatq2.13	Msatq2.16	exploitable?
Q2A/49	E	E	E	E	E	oui
Q2A/50	H	E	E	E	E	oui
Q2A/51	D	D	D	D	D	oui
Q2A/52	H	H	H	H	H	oui
Q2A/53	H	H	H	H	H	oui
Q2A/54	E	E	E	E	E	oui
Q2A/55	x	x	x	x	x	non
Q2A/56	H	H	H	H	H	oui
Q2A/57	H	H	H	H	H	oui
Q2A/58	x	x	x	x	x	non
Q2A/59	E	E	E	H	H	oui
Q2A/60	D	D	D	E	E	oui
Q2A/61	H	H	H	H	H	oui
Q2A/62	E	E	E	E	E	oui
Q2A/63	E	E	E	E	E	oui
Q2A/64	H	H	E	E	E	oui
Q2A/65	D	D	D	D	D	oui
Q2A/66	D	D	D	D	D	oui
Q2A/67	H	H	H	D	H	oui
Q2A/68	H	H	H	D	H	oui
Q2A/69	E	E	E	E	E	oui
Q2A/70	H	H	H	H	H	oui
Q2A/71	D	D	D	H	H	oui
Q2A/72	E	E	E	E	E	oui
Q2A/73	H	H	H	E	H	oui
Q2A/74	E	E	E	E	H	oui
Q2A/75	H	H	H	H	H	oui
Q2A/76	H	H	H	H	H	oui
Q2A/77	H	H	H	x	H	oui
Q2A/78	H	H	H	D	D	oui
Q2A/79	H	E	E	E	H	oui
Q2A/80	D	D	D	D	D	oui
Q2A/81	H	H	H	E	H	oui
Q2A/82	D	D	H	E	H	oui
Q2A/83	E	E	H	H	H	oui
Q2A/84	H	H	E	E	E	oui
Q2A/85	H	H	H	H	H	oui
Q2A/86	H	H	H	H	H	oui
Q2A/87	E	E	E	E	E	oui
Q2A/88	D	D	D	D	D	oui
Q2A/89	H	H	H	x	H	oui
Q2A/90	H	H	H	E	H	oui
Q2A/91	E	E	H	H	H	oui
Q2A/92	E	E	H	H	H	oui
Q2A/93	x	x	x	x	x	non
Q2A/94	H	H	H	x	H	oui
Q2A/95	D	D	D	D	D	oui
Q2A/96	H	H	H	x	H	oui
Plante F2	Msat2.37	Msatq2.2	Msatq2.7	Msatq2.13	Msatq2.16	exploitable?
Q2B/1	H	D	D	D	D	oui
Q2B/2	E	E	E	E	E	oui
Q2B/3	H	E	E	E	E	oui
Q2B/4	D	D	D	D	D	oui
Q2B/5	H	H	H	E	E	oui
Q2B/6	E	E	E	E	E	oui
Q2B/7	H	H	H	H	H	oui
Q2B/8	H	H	H	H	H	oui
Q2B/9	H	H	H	H	H	oui
Q2B/10	E	E	E	E	E	oui
Q2B/11	H	x	H	H	H	oui
Q2B/12	H	H	H	H	H	oui
Q2B/13	H	D	D	D	D	oui
Q2B/14	E	E	x	E	E	oui
Q2B/15	D	E	E	E	E	oui
Q2B/16	E	E	x	E	E	oui
Q2B/17	D	D	D	D	D	oui
Q2B/18	H	H	H	H	H	oui
Q2B/19	D	D	D	D?	D?	oui
Q2B/20	D	D	D	D	D?	oui
Q2B/21	D	D	D	D	H	oui
Q2B/22	H	D	x	D	H	oui
Q2B/23	E	E	x	D	D	oui
Q2B/24	x	x	x	x	x	non
Q2B/25	H	D	D	D	D	oui
Q2B/26	H	H	H	H	H	oui
Q2B/27	D	D	D	D	D	oui
Q2B/28	H	E	x	E	E	oui
Q2B/29	E	E	x	E	E	oui
Q2B/30	H	D	x	x	x	non
Q2B/31	E	E	E	E	H	oui
Q2B/32	H	H	H	H	H	oui
Q2B/33	H	H?	H	D	D	oui
Q2B/34	E	E	E	x	D	oui
Q2B/35	x	x	H	E	E	non
Q2B/36	H	H	H	H	x	non
Q2B/37	D	D	D	D	D	oui
Q2B/38	E	E	E	E	E	oui
Q2B/39	D	D	D	D	H	oui
Q2B/40	H	H	x	H	H	oui
Q2B/41	E	E	x	x	x	non
Q2B/42	H	H	H	H	H	oui
Q2B/43	H	H	H	D	D	oui
Q2B/44	D	D	x	D	D	oui
Q2B/45	D	D	H	H	H	oui
Q2B/46	H	H	H	x	H	oui
Q2B/47	H	H	H	D	D	oui
Q2B/48	x	x	x	x	D	non
Plante F2	Msat2.37	Msatq2.2	Msatq2.7	Msatq2.13	Msatq2.16	exploitable?
Q2B/49	H	D	H	H	H	oui
Q2B/50	H	H	H	H	H	oui
Q2B/51	H	H	H	H	H	oui
Q2B/52	D	E	E	E	E	oui
Q2B/53	H	H	H	H	H	oui
Q2B/54	D	D	x	H	H	oui
Q2B/55	D	D	D	D	D	oui
Q2B/56	E	x	x	x	x	non
Q2B/57	E	E	E	E	E	oui
Q2B/58	E	E	E	E	E	oui
Q2B/59	H	H	H	H	H	oui
Q2B/60	H	H	H	H	H	oui
Q2B/61	D	D	D	D	D	oui
Q2B/62	H	x	H	x	H	oui
Q2B/63	H	H	H	H	H	oui
Q2B/64	D	D	E	E	E	oui
Q2B/65	H	H	x	x	E	oui
Q2B/66	H	H	x	x	E	oui
Q2B/67	E	E	x	x	E	oui
Q2B/68	H	H	H	H	H	oui
Q2B/69	D	D	D	E	E	oui
Q2B/70	x	x	H	D	D	non
Q2B/71	E	E	E	E	E	oui
Q2B/72	E	E	x	E	E	oui
Q2B/73	D	D	D	D	D	oui
Q2B/74	D	D	x	D	D	oui
Q2B/75	D	D	x	D	D	oui
Q2B/76	H	H	H	H	H	oui
Q2B/77	H	H	H	H	H	oui
Q2B/78	D	D	x	D	D	oui
Q2B/79	H	H	H	H	x	non
Q2B/80	H	H	x	H	E	oui
Q2B/81	E	E	E	E	E	oui
Q2B/82	E	E	E	E	E	oui
Q2B/83	H	E	E	E	H	oui
Q2B/84	E	E	D	D	D	oui
Q2B/85	D	D	D	D	D	oui
Q2B/86	H	E?	H	H	H	oui
Q2B/87	H	H	H	H	H	oui
Q2B/88	E	E	x	x	E	oui
Q2B/89	E	E	E	E	E	oui
Q2B/90	E	E	E	E	E	oui
Q2B/91	E	E	H	H?	H	oui
Q2B/92	D	D	D	E	E	oui
Q2B/93	H	H	H	H	H	oui
Q2B/94	D	D	H	H	H	oui
Q2B/95	E	E	E	D	D	oui
Q2B/96	H	H	x	H	H	oui

Tableau 15. Regroupement des plantes F2 issues du croisement DE022 x DE073 selon leurs génotypes au niveau des marqueurs MSAT2.37 et Msatq2.16. Le tableau montre les résultats pour 176 plantes dont les résultats étaient exploitables. D : la plante porte le génotype D homozygote au marqueur, E : la plante porte le génotype E homozygote au marqueur, H : la plante est hétérozygote au marqueur.

MSAT2.37	Msatq2.16	N
D	D	26
E	E	32
H	H	67
E	D	7
D	E	6
E	H	7
H	E	14
D	H	8
H	D	9

6.2.3. Vérification du QTL2

Treize lignées recombinantes ont été choisies pour vérifier la présence d'un QTL pour la résistance contre les nématodes à galles *M. javanica* sur le chromosome 2 d'*Arabidopsis*. Ces lignées avaient été classées selon une recombinaison entre les génomes parentaux dans la région candidate de QTL, autrement dit entre les marqueurs Msatq2.2 et Msatq2.16 (**Tableaux 13 et 14**), à l'exception de la lignée Q2A/44 qui était hétérozygote au niveau de tous ces marqueurs. De plus, ces 13 lignées ont été génotypées par d'autres marqueurs répartis sur le chromosome 2, en utilisant l'ADN de plantes F2 et/ou F3. Ces marqueurs incluent Msat2.18, Msat2.11, T20K24, F3K23, Msat2.37, A21 et Msat2.22 ; ces derniers marqueurs ont été décrits par Pfalz *et al.* (2007). Le **Tableau 16** montre les génotypes corrigés de ces 13 lignées. Pour 3 de ces lignées, Q2A/28, Q2A/91 et Q2B/91, la classification initiale recombiné entre Msatq2.2 et Msatq2.16 était erronée ; ces lignées n'avaient pas recombinée dans la région candidate de QTL, mais ailleurs sur le chromosome 2.

Tableau 16. Les génotypes au long du chromosome 2 de 13 lignées F2 utilisées pour la vérification du QTL2. Ces plantes sont issues du croisement DE022 x DE073. Le tableau montre les génotypes corrigés ; de ce fait, pour les lignées Q2A/28, Q2A/91 et Q2B/91 le génotype au niveau de L'intervalle candidate du QTL2 (surligné gris) ne correspond pas aux génotypes montrés dans le **Tableaux 14**. D : la lignée porte le génotype D homozygote au marqueur, E : la lignée porte le génotype E homozygote au marqueur, H : la lignée est hétérozygote au niveau du marqueur.

	MSAT2.18	MSAT2.11	T20K24	F3K23	MSAT2.37	Msatq2.2	Msatq2.7	Msatq2.13	Msatq2.16	A21	Msat2.22
Q2A/28*	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	E
Q2A/31	D	D	D	D	H	H	E	E	E	E	E
Q2A/38	E	H	H	H	H	H	D	D	D	D	D
Q2A/44	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Q2A/59	E	E	E	E	E	E	E	H	H	H	H
Q2A/71	D	D	D	D	D	D	D	H	H	H	E
Q2A/79	H	H	H	H	H	E	E	E	H	H	H
Q2A/83	E	E	E	E	E	E	H	H	H	H	H
Q2A/84	H	H	H	H	H	H	E	E	E	E	E
Q2A/91*	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	E
Q2A/92	E	E	E	E	E	E	H	H	H	H	H
Q2B/31	E	E	E	E	E	E	E	E	H	H	H
Q2B/91*	E	E	E	H	H	H	H	H	H	H	H

Pour chacune de ces lignées F2, 40 plantes F3 ont été cultivées individuellement, sur des soucoupes en plastique. A cause des limitations d'espace dans la chambre de culture, ces plantes ont été cultivées en deux séries indépendantes, la première série avec les plantes F3 de 8 de ces lignées recombinantes (Q2A/44, Q2A/59, Q2A/79, Q2A/83, Q2A/91, Q2A/92, Q2B/31 et Q2B/91), la deuxième série avec les autres 5 lignées (Q2A/28, Q2A/31, Q2A/38, Q2A/71 et Q2A/84). Ces plantes ont été inoculées avec des juvéniles de nématodes *M. javanica* : 130 (\pm 5 SEM) pour série 1 et 88,3 (\pm 2,5 SEM) pour série 2. Le **Tableau 17** montre les données obtenues pour les deux séries de l'expérience, ainsi que les données obtenues pour une deuxième expérience avec 4 lignées (voir en-dessous).

Les feuilles pour le génotypage des plantes F3 ont été échantillonnées une semaine avant l'analyse nématologique, soit trois semaines après l'inoculation par les nématodes à galles. Les marqueurs Msatq2.2 ou Msatq2.16 ont été utilisés pour le génotypage de plantes F3, basé sur les résultats du génotypage antérieur de lignées F2. Le comptage du nombre de galles a été effectué sur les plantes homozygotes D ou E au niveau de l'intervalle ségrégant. Pour chaque lignée, entre 5 et 9 plantes ont été analysées par génotype D et E. Au total, 163 plantes F3 ont été phénotypées pour leur nombre de galles.

En moyenne, 77,6 (\pm 1,3 SEM) galles et 70,3 galles (\pm 1,7 SEM) par plante ont été trouvées pour la première et la deuxième série de l'expérience, respectivement. Le nombre de galles provoqués par des nématodes était plus faible pour les génotypes D que pour les génotypes E : dans la première série, D avait en moyenne 74,1 galles (\pm 1,99 SEM) et E avait en moyenne 81,1 galles (\pm 1,99 SEM) ; dans la deuxième série, D avait en moyenne 67,5 galles (\pm 1,99 SEM) et E avait 73,2 galles (\pm 2,02 SEM). Nous avons analysé avec un modèle linéaire généralisé le nombre de galles par plante en fonction de la série, la lignée et le génotype : « Nombre de galles = Constant + Série\$ + Lignée\$ + Génotype\$ ». L'influence de la lignée était marginalement non-significative ($F_{11, 149} = 1,73$; $P = 0,073$). Par contre, les influences de la série ($F_{1, 149} = 6,44$; $P < 0,05$) et du génotype ($F_{1, 149} = 10,90$; $P < 0,01$) étaient significatives.

Pour chaque lignée, les moyennes de nombres de galles trouvés sur les racines des deux génotypes homozygotes ont été comparées par des tests *t* de Student bilatéraux. Trois lignées, Q2A/28, Q2A/83, et Q2A/91 montraient des différences statistiquement significatives entre les deux génotypes D et E ; en moyenne, le nombre de galles était plus haut sur les génotypes E. Les différences restaient significatives après correction pour des tests multiples, en permettant un taux de fausses découvertes (FDR) de 0,05. Pour deux autres lignées, Q2A/44 et Q2A/71, les différences étaient marginalement non-significatives ; cependant, ces différences n'étaient pas significatives après correction pour des tests multiples. La **Figure 24** montre les moyennes des nombres de galles sur les deux génotypes homozygotes (D et E) de chaque lignée, et les résultats des tests *t* de Student.

Tableau 17. Les résultats du comptage de galles sur les racines des lignées recombinées. Le tableau montre les lignées, les génotypes (D, E), les résultats du comptage de galles pour 5 à 9 réplicats par lignée, génotype et expérience, ainsi que les moyennes et les SEM pour chaque combinaison de lignée et génotype. *Ce résultat n'a pas été pris en compte dans les analyses.

	Lignée	Génotype	Nombres de galles										Moyenne	SEM
Expérience 1 Séries 1	Q2A/44	D	75	71	61	63	67						67.4	2.6
		E	65	80	91	74	97						81.4	5.8
	Q2A/59	D	88	69	52	61	99						73.8	8.7
		E	53	78	57	81	92						72.2	7.4
	Q2A/79	D	103	73	80	75	72						80.6	5.8
		E	95	78	63	70	65						74.2	5.8
	Q2A/83	D	65	73	57	66	62	64	67				64.9	1.8
		E	92	82	60	75	90	75	87				80.1	4.2
	Q2A/91	D	70	77	94	85	65	54	61	40	56		66.9	5.6
		E	104	107	103	94	109	88	98	71	85		95.4	4.1
	Q2A/92	D	75	80	71	101	74	86	63	85			79.4	4.1
		E	83	106	83	73	82	71	65	75			79.8	4.4
	Q2B/31	D	70	90	83	77	88						81.6	3.7
		E	72	94	69	73	89						79.4	5.1
	Q2B/91	D	92	103	94	58	75						84.4	8.0
		E	81	84	66	74	73						75.6	3.2
Séries 2	Q2A/28	D	52	75	48	62	45	69	62	54			58.4	3.7
		E	79	69	68	84	76	85	76	67			75.5	2.5
	Q2A/31	D	62	52	70	68	77						65.8	4.2
		E	61	49	71	67	64						62.4	3.7
	Q2A/38	D	61	85	75	24	73						63.6	10.6
		E	80	65	51	72	61						65.8	4.9
	Q2A/71	D	85	73	63	71	74	77	72				73.6	2.5
		E	87	87	74	78	80	86	71				80.4	2.5
	Q2A/84	D	73	75	62	75	67	80	79	86			74.6	2.7
		E	76	77	79	68	79	73	81	8*			76.1	1.7
Expérience 2	Q2A/44	D	118	111	88	81	84						96.4	7.6
		E	111	113	96	106	94						104.0	3.9
	Q2A/83	D	141	107	83	96	86	90	90	92			98.1	6.6
		E	142	98	123	113	92	100	111	97			109.5	5.9
	Q2A/91	D	93	99	84	76	80						86.4	4.2
		E	119	115	114	106	100						110.8	3.4
	Q2A/92	D	99	126	108	93	97						104.6	5.9
		E	98	90	122	72	91						94.6	8.1

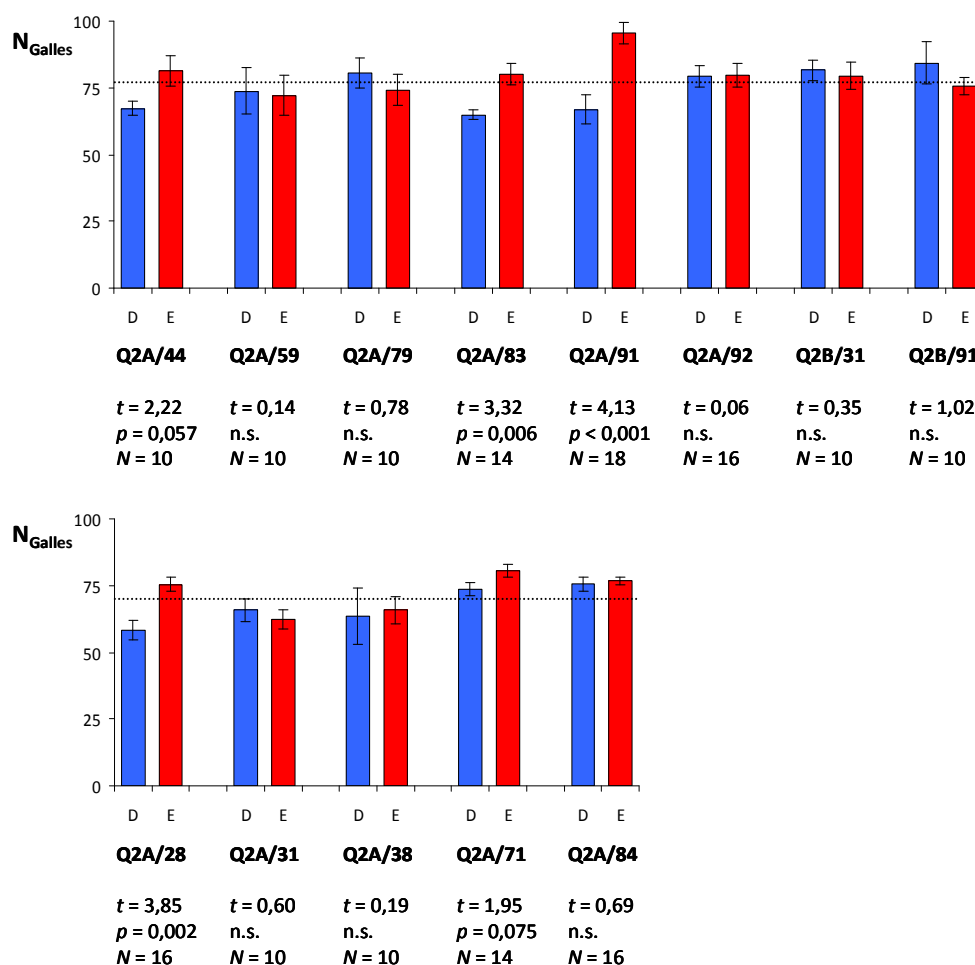


Figure 24. Nombres moyennes (\pm SEM) de galles par génotype pour 13 lignées F3 recombinantes issues d'un croisement entre DE022 et DE073. L'expérience avait été conduite en deux séries de 8 (en haut) et 5 (en bas) lignées à 40 plantes, respectivement. Seulement les plantes homozygotes (D ou E) à l'intervalle recombinant ont été phénotypées. La signification de chaque différence de nombre moyen de galles entre les génotypes D et E d'une lignée a été testée par un test *t* de Student bilatéraux, et les résultats sont indiqués au-dessous des lignées. Les lignes noires en pointillés indiquent les moyennes de nombres de galles par plante d'une série de l'expérience.

Afin de nous permettre d'analyser l'ensemble de deux séries de plantes recombinantes, la moyenne globale d'une série a été calculée en divisant le nombre total de galles trouvé sur les racines des plantes par le nombre de plantes de la série. Ensuite, la différence entre le nombre de galles observé sur chaque plante et la moyenne globale de sa série a été calculée, et divisée par la moyenne globale de sa série, afin d'obtenir des différences standardisées. Le **Figure 25** montre ces différences standardisées pour l'ensemble de 13 lignées recombinantes. Finalement, l'association entre cette différence standardisée, et les génotypes (D ou E) a été testée à plusieurs marqueurs du chromosome 2 en utilisant des ANOVAs à un facteur. L'ANOVA pour le marqueur Msatq2.13 montrait la plus forte association entre phénotype et génotype ($F_{1,161} = 18,3$; $P < 0,00003$). Ce marqueur (Msatq2.13) se trouve dans l'intervalle candidate du QTL2. A ce marqueur, le génotype D homozygote a eu une différence standardisée de $-0,070 (\pm 0,021 \text{ SEM})$

et le génotype E homozygote a eu une différence standardisée de +0,045 ($\pm 0,017$ SEM), indiquant que les plantes portant un génotype D à ce marqueur abritaient d'environ 7% moins de galles de nématodes que la moyenne, alors que les plantes portant un génotype E abritaient d'environ 4,5% plus de galles.

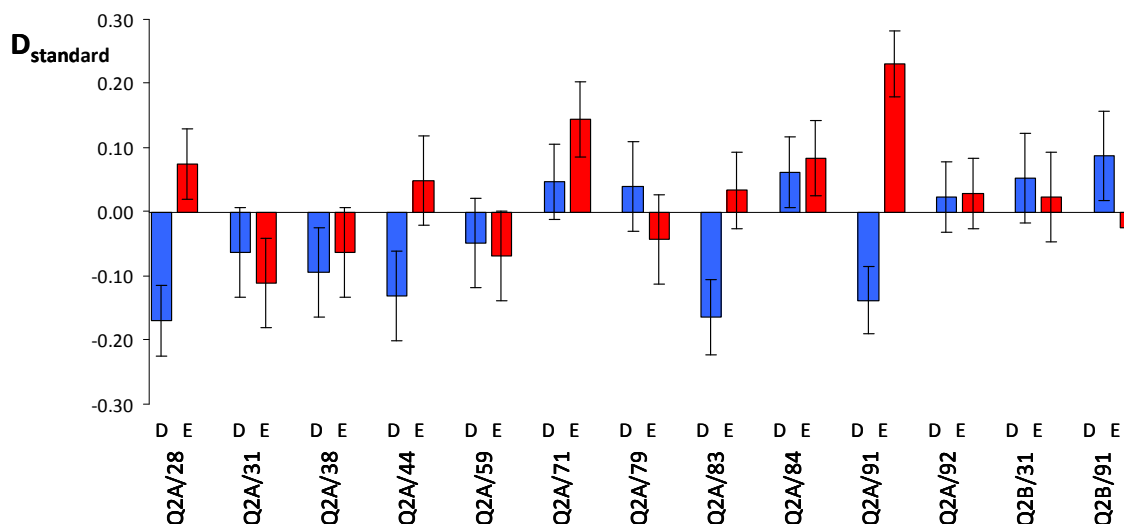


Figure 25. Différences standardisées (\pm SEM) de nombre de galles pour les 13 lignées F3 recombinantes issues d'un croisement entre DE022 et DE073. Pour chacune des deux séries de l'expérience, on a calculé le nombre moyen de galles par plante pour la série. Ensuite pour chaque plante, on a calculé la différence entre le nombre de galles observé et la moyenne globale de la série, puis on a divisé cette différence par le nombre moyen de galles de la série afin d'obtenir une différence standardisée (D_{standard}). La figure montre les moyennes des différences standardisées pour les deux génotypes homozygotes (D et E) de chaque lignée.

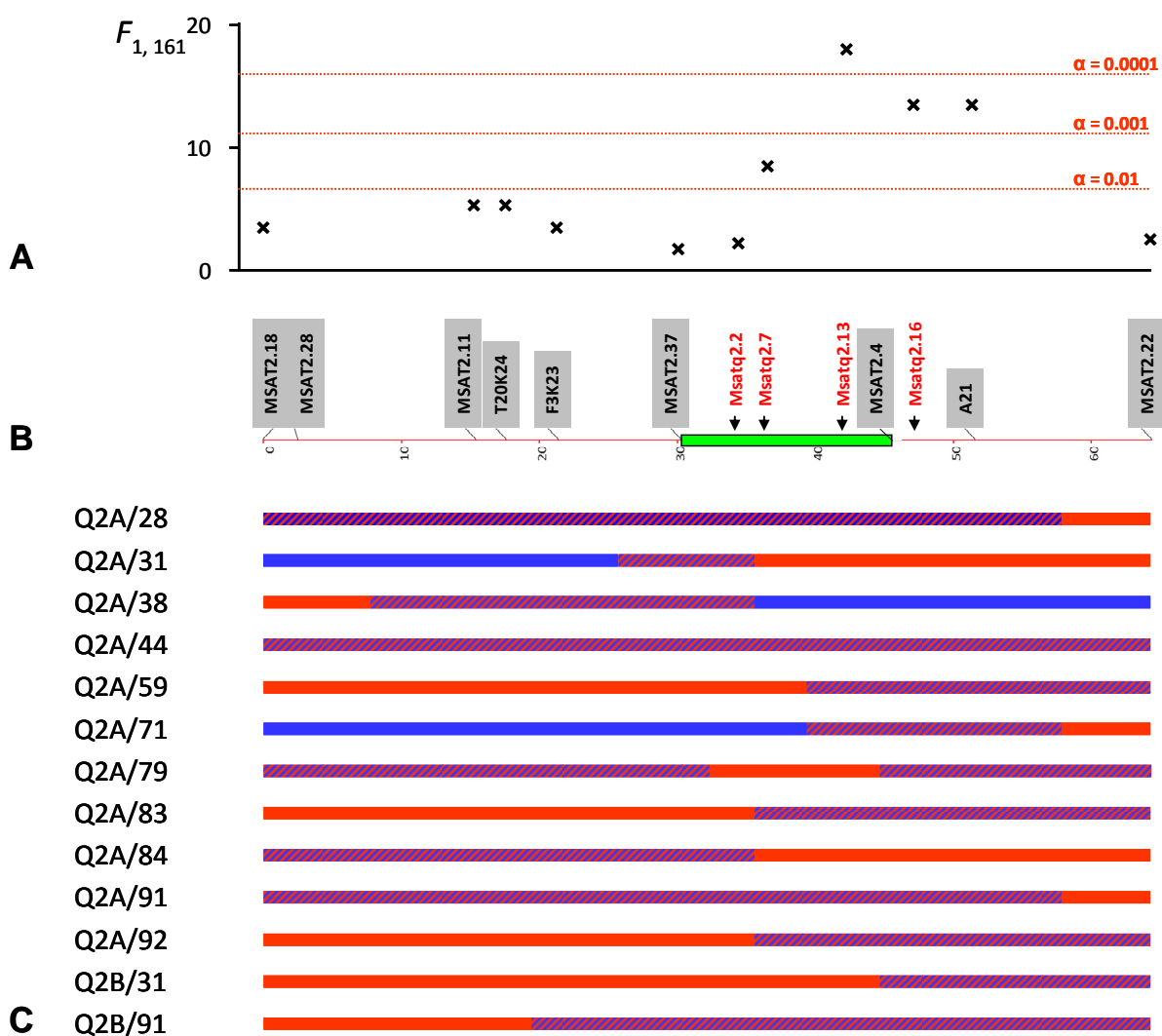


Figure 26. Vérification de la présence d'un QTL pour la résistance contre *M. javanica* sur le chromosome 2 d'*Arabidopsis*. **A.** Test statistique (F) pour la présence d'un QTL de résistance contre *M. javanica* aux marqueurs génétiques du chromosome 2 d'*Arabidopsis*. L'association entre génotype et phénotype a été testée à chaque marqueur, à l'exception des marqueurs Msa2.37 et Msa2.4. Les lignes rouges horizontales indiquent les seuils de signification à $\alpha = 0,01$, $\alpha = 0,001$ et $\alpha = 0,0001$ pour $F_{1, 161}$. **B.** Position des marqueurs sur la carte génétique du chromosome 2 d'*Arabidopsis* en centiMorgans. La barre verte indique la région candidate du QTL2, entre marqueurs Msa2.37 et Msa2.4. **C.** Génotypes de 13 lignées F2 issues d'un croisement entre les RILs DE022 et DE073 : D (bleu), Hétérozygote (motif bleu/rouge), et E (rouge). Les génotypes de ces lignées ont été déterminés sur la base de l'ADN des plantes F2 et/ou l'ADN de plusieurs plantes F3 à tous marqueurs indiqués en B (à l'exception des marqueurs Msa2.38 et Msa2.4), qui a permis de déterminer où se trouvent (entre quelle paire de marqueurs) les points de recombinaison. Pour chaque lignée les points de recombinaison ont été placés arbitrairement au centre des intervalles flanqués par deux marqueurs aux génotypes différents. Notez que Msa2q2.13, placé dans l'intervalle candidate de QTL2, montre la plus forte association entre génotype et phénotype.

Pour 4 lignées, Q2A/44, Q2A/83, Q2A/91 et Q2A/92, l'inoculation avec des juvéniles de nématodes *M. javanica* a été répétée dans une deuxième expérience indépendante, avec entre 5 et 8 plantes par génotype et lignée. Le nombre de galls sur les racines des plantes a été compté. Les résultats pour chaque génotype et lignée sont présentés comme différences de la moyenne globale, standardisés comme

expliqué plus haut. Globalement, comme dans la première expérience, on trouvait que les génotypes homozygotes D avaient en moyenne moins de galles que les génotypes homozygotes E ($F_{1,30} = 8,35$; $P < 0,01$), à part pour la lignée Q2A/92 pour laquelle il n'y a pas de différence.

La **Figure 27** montre les différences standardisées obtenues dans les deux expériences. Nous avons analysé si les deux expériences sont cohérent en utilisant le modèle « Différences standardisées = Constant + Expérience\$ + Lignée\$ + Génotype\$ + Lignée\$*Génotype\$ ». Les influences du génotype ($F_{1,95} = 22,2$; $P < 0,00001$) et l'interaction entre la lignée et le génotype ($F_{3,95} = 6,3$; $P < 0,001$) étaient hautement significatives ; par contre, les influences de la lignée ($F_{3,95} = 0,52$; $P = 0,67$) et de l'expérience ($F_{1,95} = 0,05$; $P = 0,82$) étaient non-significatives. Alors, ces deux expériences aboutissaient à des résultats cohérents.

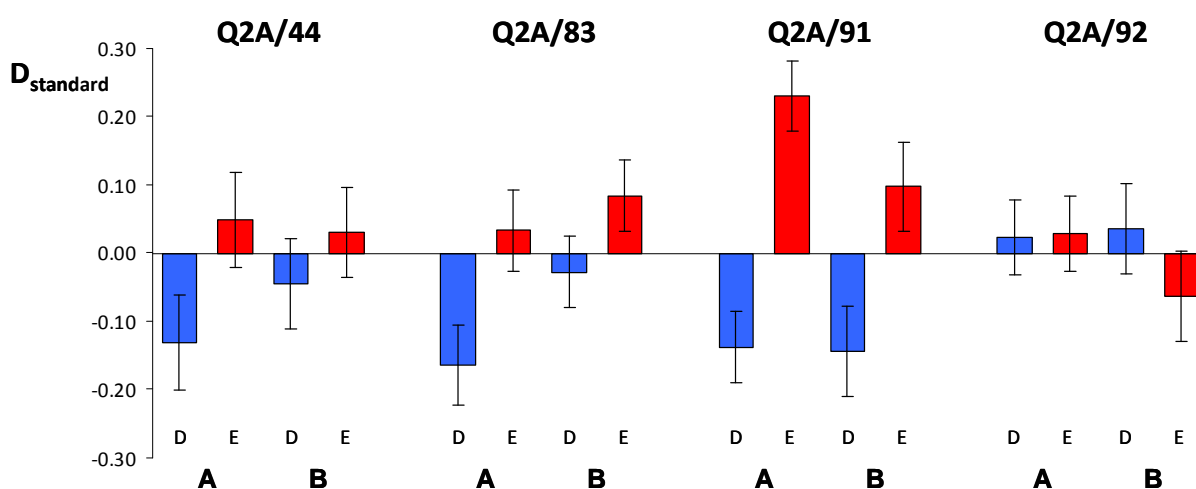


Figure 27. Comparaison des différences standardisées (D_{standard} , \pm SEM) pour le nombre de galles pour 4 lignées ségréguées, Q2A/44, Q2A/83, Q2A/91 et Q2A/92, dans deux expériences indépendantes (A, les mêmes données qui sont déjà présentées en Figure 25, et B). Chaque lignée est représentée par deux génotypes homozygotes (D, E). Les génotypes D ont, en moyenne, moins de galles que les génotypes E, à l'exception de la lignée Q2A/92.

6.2.4. Cartographie des points de recombinaison

Trois lignées recombinantes montraient des différences statistiquement significatives entre les génotypes homozygotes D et E, incluant les lignées Q2A/28, Q2A/83, et Q2A/91. Initialement, ces trois lignées avaient été classées comme ayant recombinées dans l'intervalle entre marqueurs Msatq2.2 et Msatq2.7. De même, cinq autres lignées, Q2A/31, Q2A/38, Q2A/84, Q2A/92 et Q2B/91, avaient été initialement classés recombinées entre ces mêmes marqueurs. Ces cinq lignées ne montraient pas de différences statistiquement significatives entre les nombres de galles trouvés sur les racines des deux génotypes D et E dans les intervalles ségrégués. Ces résultats suggéraient – initialement – la présence du

QTL2 dans cet intervalle. Donc, on a entrepris la cartographie fine des points de recombinaison de ces lignées pour délimiter encore l'intervalle candidate du QTL2.

Pour la cartographie des points de recombinaison, presque 50 marqueurs ont été développés. Quarante-trois de ces marqueurs ont correctement amplifié de l'ADN, soit d'un ou de plusieurs échantillons des lignées recombinantes et/ou des accessions parentaux de la population RIL, Da(1)-12 et Ei-2 (**Tableaux 5, 17**). Le séquençage direct de Sanger de ces produits PCR a délivré les séquences complètes de 32 et partielles des 11 restants de ces marqueurs. La plupart des marqueurs, même ceux avec séquences partielles, sont informatifs ; le séquençage de 29 parmi eux a détecté des polymorphismes des types 'SNP' et/ou 'indel'. Pour 12 marqueurs aucun polymorphisme n'a été détecté entre les génotypes D et E, mais ces séquences étaient néanmoins informatives aussi en aidant à réduire l'intervalle qui pourrait inclure le QTL.

Seules 5 lignées Q2A/31, Q2A/38, Q2A/83, Q2A/84 et Q2A/92, avaient été véritablement recombinées entre marqueurs Msatq2.2 et Msatq2.7 (**Figure 26**). Les points de recombinaison de Q2A/28 et Q2A/91 ont été localisés plus à droite, entre les marqueurs A21 et Msat2.22 ; les F3 de ces lignées ségrégaient pour la plus grande partie de chromosome 2. Les phénotypes observés de ces deux lignées sont compatibles avec la présence d'un QTL pour le nombre de galles sur chromosome 2 d'*Arabidopsis*, mais la position de leurs points de recombinaison n'aide pas à restreindre encore l'intervalle candidate du QTL.

La seule lignée qui avait été recombinée entre marqueurs Msatq2.2 et Msatq2.7 et qui montrait une différence significative entre les deux génotypes de son intervalle ségrégant, était Q2A/83. Les plantes F3 de cette lignée sont homozygotes E 'à gauche' jusqu'au marqueur SNPy1 (voir **Tableau 17**), et ségrégaient à partir du marqueur SNPy2, suggérant la présence d'un QTL à droite du marqueur SNPy1. Cependant, la lignée Q2A/92, pour laquelle les deux génotypes homozygotes de la F3 ne montraient pas de différence phénotypique significative, est aussi homozygote E 'à gauche' et ségrégant 'à droite'. Or, cette lignée avait été recombinée plus 'à gauche' que la lignée Q2A/83, suggérant l'absence d'un QTL à droite du marqueur SNPx5 (et aussi l'absence d'un QTL à droite du marqueur SNPy1 qui est inclus dans l'intervalle ségrégant de cette lignée ; **Figure 28**).

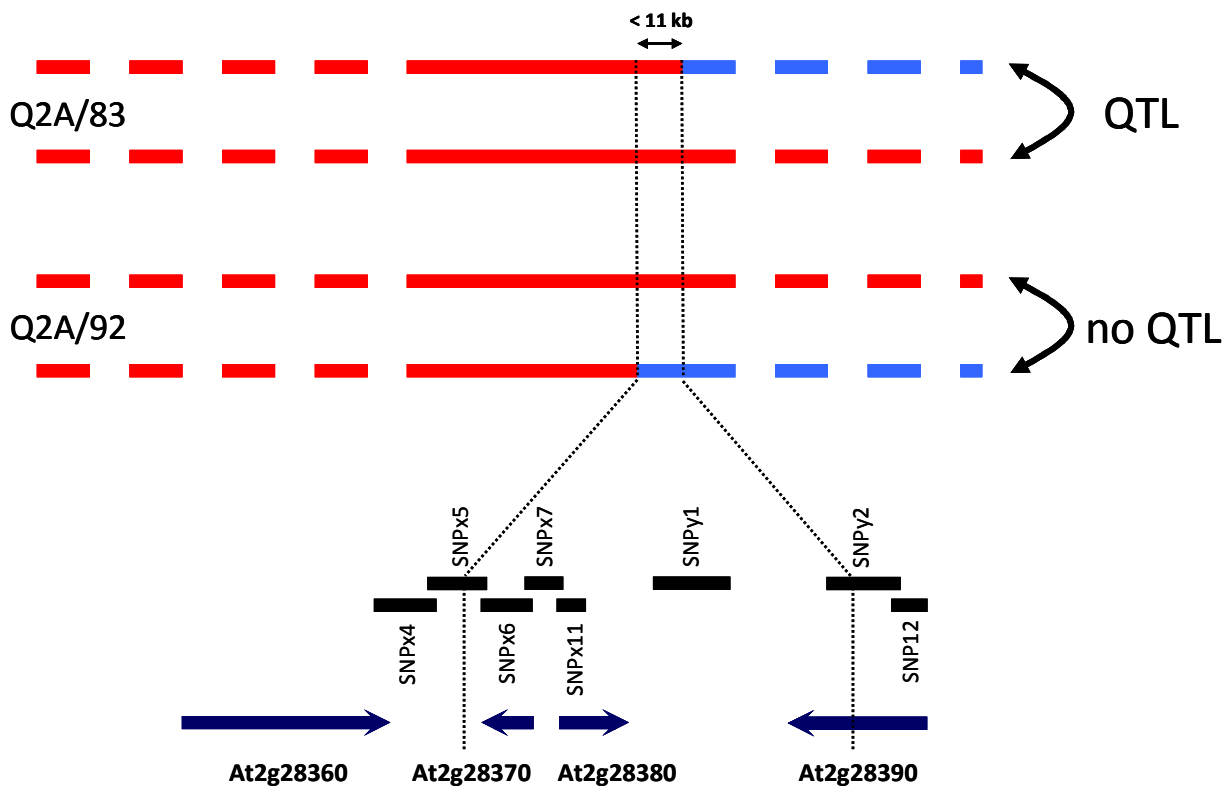


Figure 28. La relation entre la présence ou l'absence d'une différence de nombre de galles entre les génotypes des lignées Q2A/83 et Q2A/92 et leurs points de recombinaison. Chacune de ces deux lignées est représentée par deux génotypes, soit homozygote E tout au long du chromosome 2 (lignes rouges horizontales) ; soit homozygote E 'à gauche' et homozygote D 'à droite' (lignes bleues horizontales). Le point de recombinaison de la lignée Q2A/92 (en bas) se trouve environ 11 kb plus à gauche celui de la lignée Q2A/83 (en haut). Donc, dans cette région proche au QTL2 la partie qui ségrège de la lignée Q2A/92 est un peu plus grande que celle de la lignée Q2A/83, et englobe trois gènes, At2g28370, At2g28380 et At2g28390 (flèches bleues foncées, tout en bas). Les barres horizontales noires indiquent les marqueurs utilisés pour positionner les points de recombinaison. Chez la lignée Q2A/92 on ne trouve pas de différence en nombre de galles entre les deux génotypes, donc le QTL n'est pas détectable. Chez la lignée Q2A/83 le génotype E a plus de galles sur ces racines, donc on détecte le QTL. Le génotype d'au moins un des trois gènes At2g28370, At2g28380 ou At2g28390 détermine, donc, si QTL2 est détectable (Q2A/83) ou pas (Q2A/92).

Tableau 18. Les produits PCR utilisés pour la cartographie par séquençage. Les positions des marqueurs sur le chromosome 2 de génome référence Col-0, leur taille, le(s) type(s) de polymorphisme détecté(s), et les résultats de séquençage pour 8 lignées recombinantes issues d'un croisement entre DE022 et DE073. Ces résultats indiquent si les ADNs des accessions Da(1)-12 ou Ei-2 ont été séquencés (x), et les génotypes pour les lignées recombinantes, D, E, et H (=hétérozygote). Le séquençage des lignées aux marqueurs non-polymorphes est aussi indiqué par x. Les cases en jaune indiquent les marqueurs entourant les points de recombinaisons. Notez que seulement 5 des 8 lignées du tableau avaient été recombinées entre Msatq2.2 et Msatq2.7.

Marqueur	Position (début)	Position (fin)	Taille [bp]	Q2A/28	Q2A/31	Q2A/38	Q2A/71	Q2A/83	Q2A/84	Q2A/91	Q2A/92	Da(1)-12	Ei-2	Séquencé?	Nature de polymorphisme(s)
Msatq2.2	11940208	11940439	231	H	H	H	D	E	H	H	E				microsatellite
SNP2	12000710	12001315	605		H	H	D	E	H	H	E	x	x	complètement	SNP
SNPz12	12009918	12011274	1356							H		x	x	complètement	SNP
SNPz4	12014552	12016294	1742							x		x	x	complètement	none
SNPz11	12016221	12017771	1550							x		x	x	complètement	none
SNPz13	12017666	12018842	1176							x		x	x	complètement	none
SNPz10	12030216	12032204	1988							H		x	x	partiellement	SNP
SNP3	12041050	12041680	630	x	x	x	x	x		x	x			complètement	none
SNPz9	12041572	12044090	2518							H		x		partiellement	SNP
SNPz5	12044009	12046331	2322							x		x	x	partiellement	none
SNPz6	12050497	12051984	1487							x		x	x	complètement	none
SNPz7	12053849	12054957	1108							x		x	x	complètement	none
SNPz2	12063232	12065075	1843							H		x	x	partiellement	SNP
SNP4	12071915	12072525	610	x	x	x	x	x	x	x	x			complètement	none
SNPz3	12094858	12096862	2004							x		x	x	partiellement	none
SNP5	12124605	12125215	610			H	D	E	H	H	E			complètement	SNP
SNPx1	12125340	12126701	1361							H	E	x	x	complètement	indel, SNP
SNPx2	12126631	12128160	1529					E		H	E	x	x	complètement	SNP
SNPx3	12128089	12129569	1480					E		H	E	x	x	complètement	indel, SNP
SNPx4	12129495	12130954	1459					E		H	E	x	x	complètement	indel, SNP
SNPx5	12130870	12132288	1418							H	E/H	x	x	complètement	indel, SNP
SNPx6	12132201	12133420	1219							H	H	x	x	complètement	SNP
SNPx7	12133290	12134126	836							x	x	x	x	complètement	none
SNP11	12134130	12134793	663					E		H	H	x	x	complètement	SNP
SNPy1	12136573	12138350	1777					E				x	x	complètement	indel, SNP
SNPy2	12140916	12142675	1759					H				x	x	complètement	SNP
SNP12	12142560	12143353	793							x	x		x	complètement	^b
SNPy3	12147055	12148699	1644					x				x	x	partiellement	none
SNP13	12148576	12148977	401					H		H	H	x	x	complètement	SNP
SNP6	12161308	12161880	572	H	H	H	D	H	H	H	H	x	x	complètement	indel, SNP
SNP7	12199420	12199945	525		x	x	x	x	x	x	x			complètement	none
SNP8	12247107	12247625	518	H	H	D	D	H	H	H	H			complètement	SNP
SNPa1	12301661	12303393	1732	H	H				H			x	x	partiellement	indel, SNP
SNP10 ^a	12317980	12318505	525	x	x	D	D	x	x	x	x	x	x	complètement	SNP
SNPa2	12354706	12356686	1980	H	H/E				H			x	x	partiellement	SNP
SNPa3	12367110	12368486	1376	H	E				H					partiellement	SNP
SNPa10	12371988	12373412	1424						E			x	x	complètement	indel, SNP
SNPa4	12378548	12380417	1869	H	E				E					complètement	SNP
SNPa5	12383847	12384886	1039	H								x	x	complètement	SNP
SNPa6	12386043	12387144	1101	H								x	x	complètement	indel, SNP
SNPa7	12388709	12389748	1039	H								x	x	complètement	SNP
SNPa8	12394519	12395672	1153	H								x	x	complètement	indel, SNP
SNPa9	12400001	12401936	1935	H								x	x	partiellement	indel, SNP
SNPa11	12401839	12404199	2360									x		partiellement	^b
Msatq2.7	12404734	12405002	268	H	E	D	D	H	E	H	H				microsatellite

^a le séquençage des produits PCR n'avait pas distingué entre les génotypes hétérozygotes (H) et Ei-2 (E)

^b le nombre et type de séquences n'a pas suffi pour déterminer s'il y avait des polymorphismes

6.3. Discussion

L'analyse globale de la descendance de 13 lignées F2 issues d'un croisement entre les RILs DE022 et DE073, suggère fortement la présence d'un QTL sur le chromosome 2 d'*Arabidopsis* pour le nombre de galles provoquées par des nématodes *M. javanica*. Le marqueur avec le test statistique le plus fort pour la présence d'un QTL est Msatq2.13. Ce marqueur est positionné dans l'intervalle candidate de QTL2, qui était préalablement déterminé par la cartographie de QTL en utilisant la population RIL Da(1)-12 x Ei-2. La direction de l'effet de QTL associé avec Msatq2.13 est la même que celle du QTL2 : Les plantes d'*Arabidopsis* qui portent le génotype D homozygote au Msatq2.13 ont moins de galles sur leurs racines que les plantes qui portent le génotype E homozygote. Néanmoins, les résultats des analyses de lignées individuelles ne sont pas toujours d'accord avec l'analyse globale, mené sur toutes les lignées : Par exemple, les deux génotypes par lesquels la lignée Q2A/31 est représentée sont E homozygotes à droite, à partir du marqueur Msat2.7. En conséquence, les deux génotypes devraient porter l'allèle haut pour le nombre de galles au niveau de QTL2, mais le nombre de galles sur les racines des deux génotypes de la lignée Q2A/31 était plutôt faible. D'une manière similaire, les combinaisons entre les génotypes et les phénotypes des lignées Q2A/59, Q2A/71, Q2A/92 et Q2B/91 ne soutiennent pas la présence d'un QTL pour le nombre de galles proche du marqueur Msatq2.13. Cependant, la majorité de lignées, Q2A/28, Q2A/38, Q2A/44, Q2A/83, Q2A/84, Q2A/91, Q2B/31 et probablement aussi Q2A/79, sont compatible avec la présence d'un QTL dans l'intervalle candidate du QTL2, proche du marqueur Msatq2.13.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer le désaccord des résultats entre l'analyse globale et les analyses des lignées individuelles : (i) Des effets stochastiques, concernant par exemple le nombre de juvéniles de nématodes inoculés avec les plantes seront plus important dans l'analyse des lignées individuelles à cause de la petite taille des échantillons. (ii) De même, des erreurs concernant le génotypage ou le comptage de galles seront plus influentes sur les analyses individuelles. (iii) Les RILs parentales pour la génération d'une population de la cartographie fine du QTL2 ont été choisies parce qu'elles portaient des génotypes différents dans la région candidate du QTL2 et étaient génétiquement identiques aux autres QTL potentiels. Néanmoins, il y a des régions des autres chromosomes qui ségrègent dans les lignées F2 (**Figure 23**). Ces régions pourraient avoir un impact sur les phénotypes de lignées, s'ils contiennent de QTL non-détectés dans la cartographie initiale de QTL. (iv) Les génotypes des lignées ont été testés au niveau de plusieurs marqueurs placés au long du chromosome 2 (**Figure 26**), réduisant le risque de ne pas détecter de recombinaisons supplémentaires. Cependant, ce génotypage n'est pas bien adapté pour détecter des événements de conversion génique (Haubold *et al.*, 2002). Encore une fois, ce facteur aurait un plus grand impact sur les analyses individuelles que sur l'analyse global. (v) Le choix de lignées F2 pour l'analyse globale n'était pas aléatoire, mais dirigé par la présence supposée d'un point de recombinaison entre les génotypes parentaux dans l'intervalle candidate de QTL2. De ce fait, les points de recombinaison des lignées ne sont pas distribués uniformément sur le chromosome 2, ce qui peut rendre la détection des

autres QTL sur ce chromosome difficile. De même, suite à des contraintes d'espace de culture, il n'était pas possible de cultiver toutes les plantes ensemble au même temps. Cependant, le dernier problème était minimisé par la standardisation des valeurs phénotypiques des deux séries de l'expérience. De plus, certaines lignées ont été testées deux fois indépendamment pour leur résistance contre les nématodes à galles, et ces expériences ont abouti aux résultats cohérents.

Finalement, (vi) l'architecture génétique du QTL2 n'est pas connue. Ce QTL pourrait être causé par un seul gène à effet majeur. Mais il est également possible que plusieurs gènes aux petits effets contrôlent ce QTL. Il y a des exemples qui montrent une architecture complexe des QTL (Steinmetz *et al.*, 2002 ; Kroymann *et al.*, 2005 ; Sinha *et al.*, 2006 ; Cook *et al.*, 2012) : Pour la levure, Steinmetz *et al.* ont identifié trois gènes liés étroitement qui, en interagissent entre eux et avec le fond génétique, expliquent la capacité de la levure à survivre et à pousser à des températures élevées (Steinmetz *et al.*, 2002 ; Sinha *et al.*, 2006). Kroymann *et al.* (2005) ont identifié deux QTL contribuant à la variation de croissance d'*Arabidopsis* dans un intervalle génomique de 210 kb. Les effets phénotypiques de ces QTL dépendaient du fond génétique. Finalement, Cook *et al.* (2012) ont trouvé que *Rhg1*, qui est un QTL majeur de résistance contre les nématodes à kyste *H. glycine* pour le soja, est composée de trois gènes dans un fragment du génome de 31 kb. La résistance contre *H. glycine* est associée avec le nombre de répétitions de ce fragment. La surexpression de l'ensemble de ces trois gènes augmentait la résistance d'une variété de soja sensible aux nématodes, alors que la surexpression de gènes isolés n'était pas efficace (Cook *et al.*, 2012).

En conclusion, l'analyse globale des lignées recombinées et la majorité des analyses individuelles des lignées recombinées soutient le résultat de la cartographie du QTL, suggérant fortement la présence de QTL2, un QTL de résistance contre le nématode à galle *M. javanica*, sur chromosome 2, proche du marqueur Msatq2.13.

Mais l'expression de QTL2 peut être influencée par l'existence d'un autre facteur génétique, éventuellement un deuxième QTL, dans la région voisine. Nous avons trouvé un signal clair pour QTL2 dans la lignée Q2A/83, mais pas de signal pour le même QTL dans la lignée Q2A/92, bien que cette dernière a un génotype très similaire, avec une partie du chromosome 2 qui est homozygote du génotype E à gauche et le reste du chromosome est ségrége (**Figure 28**). La zone qui ségrége est légèrement plus grande pour la lignée Q2A/92 par rapport à la lignée Q2A/83, avec une différence de moins de 11 kb. Cette différence englobe trois gènes, At2g28370, At2g28380 et At2g28390. Ces gènes sont homozygotes pour le génotype E dans la lignée Q2A/83 alors qu'ils ségrégent dans la descendance de Q2A/92. Si les différences phénotypiques entre Q2A/83 et Q2A/92 s'avèrent d'être réels, ces trois gènes sont des candidats pour être à l'origine d'un deuxième QTL contre les nématodes à galles *M. javanica*. Le gène At2g28370 code pour une protéine à fonction inconnue. At2g28380 encode une protéine capable de lier l'ADN double brin, DRB2, qui est impliqué dans la formation des ARN interférents (siRNAs) et la défense de plantes (Pélissier *et al.*, 2011). At2g28390 code pour une protéine de la famille de gènes SAND (Cottage *et al.*, 2004). Pour la levure, un

homologue de ce gène est impliqué dans la fusion de membranes (Wang *et al.*, 2003b). Dans la base de données d'Arabidopsis (www.arabidopsis.org), At2g28390 est annoté comme 'répondant aux nématodes', basé sur une analyse bioinformatique (Heyndrickx & Vandepoele, 2012), ce qui est un peu surprenant car ce gène est souvent utilisé comme gène de référence dans des analyses quantitatives d'expression de gènes, grâce à sa stabilité d'expression (Czechowski *et al.*, 2005).

L'utilisation des mutants d'Arabidopsis pourrait être élucidée si un (ou plusieurs) de ce trois gènes sont vraiment impliqués dans l'interaction entre Arabidopsis et les nématodes à galles *M. javanica*, et alors apporter des éléments de preuve complémentaires pour l'existence d'un QTL dans l'intervalle qui diffère entre Q2A/83 et Q2A/92. Des lignées d'Arabidopsis mutées par des insertions d'ADN-T ou des transposons existent pour ces trois gènes (signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress ; Alonso *et al.*, 2003), mais le temps restant n'était pas suffisant pour conduire cet analyse.

7. Conclusions et Perspectives

Au début de cette thèse il était connu qu'*Arabidopsis thaliana* est un hôte pour plusieurs espèces des nématodes phytoparasites, dont les nématodes à galle *Meloidogyne javanica* (Sijmons *et al.*, 1991 ; Wu *et al.*, 1998 ; Boiteux *et al.*, 1999). Il était également connu qu'il y avait de la variation génétique naturelle entre des accessions d'*Arabidopsis* pour le nombre de galles provoqués par des nématodes et aussi pour le taux de reproduction des femelles de nématodes (Sijmons *et al.*, 1991 ; Boiteux *et al.*, 1999). Cependant, cette variation chez *Arabidopsis* n'était pas encore profondément explorée; au moins, nous n'avons trouvé aucune publication décrivant l'architecture génétique de la variation naturelle pour la résistance d'*Arabidopsis* aux nématodes phytoparasites ou l'identification des QTL. Le but de cette thèse était alors d'explorer plus profondément la possibilité d'utiliser *Arabidopsis thaliana* comme une source de gènes de résistance contre des nématodes phytoparasites, d'examiner l'architecture de la variation génétique naturelle de ce caractère et, peut-être, de cloner un ou deux des QTL identifiés. Mais, d'abord, il fallait affiner des méthodes de quantification de l'interaction entre *Arabidopsis* et ces nématodes phytoparasites.

Les conditions expérimentales améliorées dans cette thèse aboutissent à un bon taux d'infection d'*Arabidopsis* et à un bon taux de fécondité des femelles de nématodes, bien supérieurs à ceux qui ont été montré dans d'autres travaux (Sijmons *et al.*, 1991 ; Boiteux *et al.*, 1999). Nos améliorations incluent l'évitement des produits chimiques pour traiter des masses d'œufs ou des juvéniles de nématodes, et l'utilisation du sable pour la culture d'*Arabidopsis* pendant l'interaction avec des nématodes. En plus, les nombres totaux de galles provoquées par les nématodes sur le système racinaire entier ont été comptés. En utilisant ces conditions expérimentales, il était possible de détecter des différences relativement faibles en nombre de galles entre des différents génotypes d'*Arabidopsis*. C'est peu probable que ces différences auront pu être détectées en utilisant des indices de galles (Zeck, 1971 ; Taylor et Sasser, 1978), qui emploient des échelles de classification relativement larges et lâches. En plus, nos conditions nous ont permis d'utiliser une quantité d'inoculum de nématodes relativement modérée, qui économise l'espace de la culture des plantes et nématodes.

Dans nos conditions, chaque expérience a duré d'environ trois mois, incluant la germination et la culture d'*Arabidopsis* dans des boîtes de Pétri (12 à 15 jours), la culture d'*Arabidopsis* dans des pots de sable, pendant 1 mois avant et 1 mois après l'inoculation avec des nématodes, et les analyses nématologiques (d'environ 1 à 2 semaines, selon le nombre d'échantillons). Un mois après inoculation, les galles étaient bien visibles sur les racines des plantes alors que la formation des masses d'œufs n'avait que débuté. Suite aux contraintes de temps pour la partie expérimentale de la thèse, le nombre de galles a été choisi comme indice de résistance d'*Arabidopsis* contre les nématodes phytoparasites. La résistance d'une plante contre les nématodes phytoparasites a plusieurs aspects ; la capacité d'empêcher l'infection et la capacité de limiter la multiplication des nématodes phytoparasites (Trudgill, 1986 ; 1991). Les expériences conduites pendant cette thèse ont ciblé la variation génétique naturelle de la résistance d'*Arabidopsis*

contre l'établissement des sites nourriciers, suivi de la formation des galles, par *Meloidogyne javanica*. En fait, l'analyse de 6 accessions d'*Arabidopsis* montrait une grande variation de plusieurs paramètres, dont le nombre de galles, la taille de galles, l'état de développement de galles, et la distribution de galles sur le système racinaire de plantes. Néanmoins, dans d'autres études, des QTL qui ont un effet sur le nombre de galles (ou l'indice de galles) co-localisent souvent avec des QTL qui influencent la fécondité des nématodes (Shen *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2012a) et il y a d'autres études qui basent l'évaluation de la résistance de plantes aux nématodes à galle seule sur l'indice de galles (Xu *et al.*, 2013).

Nous avons testée la relation entre le nombre de galles et le nombre de masses d'œufs pour 4 lignées issues d'un croisement entre deux lignées RILs de la population RIL Da(1)-12 x Ei-2 (Pfalz *et al.*, 2007), choisies pour la cartographie de QTL de résistance contre *M. javanica*. Ces lignées ont recombinaison en différents endroits du chromosome 2 d'*Arabidopsis*, et sont génétiquement presque identiques sur le reste du génome. Sur les racines de chaque lignée, les masses d'œufs étaient bien développées et mûres 2 mois après l'inoculation des plantes avec des juvéniles de nématodes. Les analyses montraient qu'il y avait une corrélation positive hautement significative entre le nombre de galles et le nombre de masses d'œufs sur deux séries de plantes inoculées avec des doses différentes des juvéniles de nématodes. Alors, au moins le QTL ségrégant sur chromosome 2 de la population Da(1)-12 x Ei-2 apparaît d'être un véritable QTL de résistance contre le nématode à galle *M. javanica*.

En plus, cette analyse de la relation entre le nombre de galles et le nombre de masses d'œufs a montrée des effets négatifs de la densité ; le succès d'infection d'*Arabidopsis* et la production de masses d'œufs dépendaient du nombre de juvéniles de nématodes inoculés : le nombre de galles provoqué par juvénile de nématode dans l'inoculum et le nombre de masses d'œufs par galle étaient plus importants lorsque la dose de nématodes dans l'inoculum était plus faible. Le premier effet pourrait être expliqué par la compétition directe entre les juvéniles de nématodes, pour des sites d'entrée dans les racines ou pour l'établissement d'un site nourricier. Le deuxième effet, concernant le taux de reproduction, est plus difficile à expliquer. Il s'agit d'un effet négatif de la densité à longue durée. Nous ne savons pas si cet effet est un résultat également d'une compétition directe entre les juvéniles de nématodes dans l'inoculum ou si cet effet est plutôt indirect, médié par la plante. En tout cas, ces effets pourraient jouer un rôle régulateur de la population de nématodes phytoparasites. Il serait intéressant d'investiguer ces phénomènes plus profondément : (i) en utilisant une plus grande échelle de doses nématodes dans l'inoculum pour vérifier et généraliser nos résultats ; (ii) en ciblant des bases moléculaires potentiels tels que l'expression de gènes et les voies de signalisation de la plante à l'échelle locale mais aussi systémique, et (iii) en testant des autres espèces de plantes et de nématodes.

Sijmons *et al.* (1991) et Boiteux *et al.* (1999) ont montré l'existence de la variation génétique naturelle de la résistance contre les nématodes phytoparasites entre des accessions d'*Arabidopsis*. Deux

expériences indépendantes, chacune en utilisant 6 accessions d'*Arabidopsis* et *M. javanica* comme nématode phytoparasite, ont confirmées ces résultats. Le nombre de galles sur les racines des accessions variait d'un facteur d'environ 2. De même, aucune des 6 accessions ne montraient une résistance complète contre *M. javanica*, de nouveau confirmant les résultats de Sijmons *et al.* (1991) et Boiteux *et al.* (1999), et suggérant une base génétique complexe et quantitative, sans gène *R* de résistance classique sous-jacent, qui typiquement confèrent une résistance complète (Hammond-Kosack & Jones, 1997 ; Ellis *et al.*, 2000 ; McHale *et al.*, 2006 ; Hammond-Kosack & Kanyuka, 2007). Plutôt, la variation de nombre de galles était de caractère quantitatif, causée par l'influence de plusieurs gènes. De fait, la cartographie de QTL conduite avec la population RIL Da(1)-12 x Ei-2 (Pfalz *et al.*, 2007), détectait la présence de 4 QTL putatifs, repartis sur les chromosomes 2 – 5 d'*Arabidopsis*. A 3 de ces QTL, la présence d'un génotype D au QTL réduisait le nombre de galles. Ce résultat était cohérent avec les analyses d'accessions, car le nombre de galles trouvé sur les racines de Da(1)-12 était diminué de moitié du nombre de galles trouvé sur les racines d'Ei-2.

Le QTL qui apparaissait d'avoir le plus grand impact sur le nombre de galles trouvées sur les racines était celui sur chromosome 2, dénommé QTL2. Les deux génotypes D et E au QTL différaient par les nombres de galles d'environ 20%, et le QTL2 expliquait presque la moitié de la variation génétique. La présence de ce QTL2 a été confirmée en utilisant une nouvelle population de cartographie, généré par le croisement entre deux lignées de la population Da(1)-12 x Ei-2, DE022 et DE073, qui portaient des génotypes identiques aux autres QTL potentiels. L'analyse de 13 lignées F3 issues de ce croisement positionnait le QTL pour le nombre de galles proche du marqueur Msatq2.13, dans l'intervalle candidate qui était préalablement identifié par la cartographie de QTL2 en utilisant la population RIL Da(1)-12 x Ei-2. De plus, la direction de l'effet de ce QTL était comme attendu : les plantes qui portaient le génotype D au QTL avaient moins de galles sur leurs racines.

Malheureusement, les 13 lignées choisies pour la cartographie fine de ce QTL n'étaient pas très utiles pour délimiter plus finement l'intervalle candidate de QTL2, suite à une classification incorrecte initiale des points de recombinaison de plusieurs lignées. En conséquence, il serait nécessaire d'identifier d'autres lignées F2 issues du croisement entre DE022 et DE073, qui ont recombinées dans l'intervalle candidate de QTL2 pour cartographier le QTL2 plus précisément. Néanmoins, il reste d'autres lignées recombinées issues du croisement entre DE022 et DE073 qui peuvent être utilisées pour une cartographie plus fine de QTL2 dans l'avenir. En plus, d'autres croisements entre des lignées RIL de la population Da(1)-12 x Ei-2 ont déjà été effectués pour confirmer la présence et/ou pour cartographier finement d'autres QTL de nombre de galles provoquées par *M. javanica* sur les racines d'*Arabidopsis*.

La classification incorrecte initiale de points de recombinaison de plusieurs lignées nous a menés à chercher le QTL2 entre les marqueurs Msatq2.2 et Msatq2.7. Ces marqueurs sont localisés dans l'intervalle candidate de QTL2 préalablement défini par la cartographie de QTL ; mais probablement, le QTL2 se trouve plutôt à droite de ces marqueurs, proche du marqueur Msatq2.13. Deux des 5 lignées qui avaient recombinaison entre Msatq2.2 et Msatq2.7 étaient presque identiques génétiquement, à l'exception de l'endroit de recombinaison. Les deux lignées étaient homozygotes E à gauche et ségrégaient à droite. Les deux génotypes homozygotes ségrégants d'une de ces lignées, Q2A/83, différaient significativement pour le nombre de galles provoquées sur les racines par *M. javanica*. Pour la deuxième lignée, Q2A/92, il n'y avait aucun soutien statistique pour une différence de ce caractère entre les deux génotypes homozygotes ségrégants de cette lignée. Ces observations suggéraient très fortement de positionner le QTL2 entre les points de recombinaison de ces deux lignées. Or, contrairement aux attentes, la cartographie très fine par le séquençage montrait que la lignée Q2A/83 avait recombinaison plus à droite que la lignée Q2A/92, générant un paradoxe: un QTL ségrégant dans un intervalle du génome qui est inclus dans un intervalle du génome un peu plus grand dans lequel le QTL ne ségrégeait pas. Si le phénotypage des génotypes de ces deux lignées était correct (le phénotypage a été conduit deux fois avec essentiellement les mêmes résultats et pourrait être vérifié par des croisements entre les lignées Q2A/83 et Q2A/92, suivi par le phénotypage des descendants des croisements), ce paradoxe pourrait être résolu par l'hypothèse que l'intervalle circonscrit par les points de recombinaison de ces deux lignées contiendrait un facteur génétique, qui agit soit comme un QTL individuel en contre-sens du QTL2, soit comme un modificateur de l'expression du QTL2. L'une des premières étapes (après une dernière vérification des phénotypes de ces deux lignées) pour résoudre ce paradoxe serait d'analyser des mutants des trois gènes qui se trouvent dans l'intervalle circonscrit par les points de recombinaison de Q2A/83 et Q2A/92.

La population RIL Da(1)-12 x Ei-2 a été préalablement utilisée pour l'identification des QTL contrôlant la résistance d'*Arabidopsis* au ravageur *Pieris brassicae* ; les hôtes de ce ravageur sont les crucifères sur lesquelles il se nourrit et pondre ses œufs (Pfalz *et al.*, 2007). Dans la même étude, plusieurs QTL impliqués dans le contrôle de la variation des métabolites secondaires ont été également identifiés (Pfalz *et al.*, 2007). Un de ces QTL a été cloné ; le gène sous-jacent codait pour une cytochrome P450 monooxygénase, impliquée dans la biosynthèse de glucosinolates, qui font partie des métabolites secondaires chez les Brassicales (Pfalz *et al.*, 2009). De plus, ce gène se révélait d'être important pour la défense d'*Arabidopsis* contre le puceron *Myzus persicae* (Pfalz *et al.*, 2009). Finalement, plusieurs autres QTL impliqués dans la biosynthèse des glucosinolates ont été clonés en utilisant Da(1)-12 x Ei-2 (Marina Pfalz, communication personnelle).

Les deux accessions parentales de cette population RIL, Da(1)-12 et Ei-2, proviennent de la République tchèque et de l'Allemagne, respectivement. *Meloidogyne javanica* est présent en Allemagne,

mais très localisé, alors que la présence de cette espèce de nématode phytoparasite n'est pas connue pour la République tchèque (<http://www.cabi.org/isc/datasheet/33246>). L'origine d'Ei-2 est la région de l'Eifel, une région qui se caractérise par des températures plutôt basses en printemps et en été (www.arabidopsis.org). Autrement dit, ces conditions ne sont pas favorables pour *M. javanica*. Pourquoi donc ségrégent des QTL de résistance contre *M. javanica* dans Da(1)-12 x Ei-2 ? Nous proposons trois types d'hypothèses pour expliquer l'existence de QTL contre *M. javanica* chez Arabidopsis. (i) Les aires de répartition de *M. javanica* et d'Arabidopsis se chevauchent. En conséquence, il serait possible que des allèles qui contribuent à la résistance contre *M. javanica* aient été sélectionnées dans une autre région, et qu'il y ait de flux de ces gènes. (ii) Les variantes résistantes qui ségrégent dans Da(1)-12 x Ei-2 n'ont pas été sélectionnées par *M. javanica*, mais par un autre ennemi d'Arabidopsis, soit une autre espèce de nématode phytoparasite, soit un ravageur ou un agent phytopathogène. Pour donner quelques exemples qui soutiennent ce type d'hypothèse, le gène *Ma*, de l'origine de myrobolan *Prunus cerasifera* confère la résistance contre nombreuses espèces de nématodes à galles dont les espèces les plus répandues de nématodes à galles *M. incognita*, *M. arenaria* et *M. javanica* (Claverie et al., 2011). Le gène *Mi-1* de la tomate confère résistance contre les nématodes à galles du genre *Meloidogyne*, mais aussi contre les pucerons de l'espèce *Macrosiphum euphorbiae* (Rossi et al., 1998 ; Vos et al., 1998). Le gène *CYP81F2* d'Arabidopsis est impliqué dans la résistance contre le puceron *M. persicae* (Pfalz et al., 2009), mais ce gène est également important pour la défense d'Arabidopsis contre des agents phytopathogènes (Bednarek et al., 2009 ; Clay et al., 2009). (iii) Les gènes qui varient entre Da(1)-12 et Ei-2 et qui contribuent à la variation de la résistance contre *M. javanica*, n'ont pas été sélectionnés par des ennemies d'Arabidopsis, mais sont impliqués dans la variation d'autres caractères des plantes, et ont, probablement, un impact sur des nématodes phytoparasites. Il serait utile de connaître les gènes sous-jacents de la variation génétique naturelle d'Arabidopsis pour la résistance contre les nématodes à galles *M. javanica* pour examiner laquelle (ou lesquelles) de ces hypothèses est (ou sont) le plus vraisemblables.

Nous avons trouvé et localisé un certain nombre d'éléments génétiques impliqués dans la résistance d'Arabidopsis contre les nématodes à galles, *M. javanica*. D'un point de vue économique, le degré de protection apporté par ces QTL n'est probablement pas d'une valeur suffisante pour être commercialisable. Par contre, d'un point de vue de la recherche fondamentale nos résultats sur la complexité de l'interaction entre Arabidopsis et le nématode *M. javanica* sont hautement intéressants. Nous avons pu observer un grand nombre de caractères liés à l'interaction, chez Arabidopsis, qui varient entre des accessions et/ou au sein de notre population RIL. Nos observations suggèrent qu'il existe de la variation génétique pour la capacité d'empêcher l'infection, mais aussi pour la forme, la taille, et la distribution des galles sur les racines, ainsi que pour l'organisation des nématodes au sein des galles et leur succès reproducteur. Ces différentes facettes de la résistance sont, en principe, quantifiables et donc

conviennent à une approche de la cartographie de QTL, ouvrant la possibilité d'explorer la complexité de l'interaction intime entre plantes et nématodes.

8. Références bibliographiques

- Abad P, Gouzy J, Aury JM, Castagnone-Sereno P, Danchin EG, Deleury E, Perfus-Barbeoch L, Anthouard V, Artiguenave F, Blok VC, Caillaud MC, Coutinho PM, Dasilva C, De Luca F, Deau F, Esquibet M, Flutre T, Goldstone JV, Hamamouch N, Hewezi T, Jaillon O, Jubin C, Leonetti P, Magliano M, Maier TR, Markov GV, McVeigh P, Pesole G, Poulain J, Robinson-Rechavi M, Sallet E, Ségurens B, Steinbach D, Tytgat T, Ugarte E, van Ghelder C, Veronico P, Baum TJ, Blaxter M, Bleve-Zacheo T, Davis EL, Ewbank JJ, Favery B, Grenier E, Henrissat B, Jones JT, Laudet V, Maule AG, Quesneville H, Rosso MN, Schiex T, Smant G, Weissenbach J and Wincker P (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nat. Biotechnol.* **26**: 909-9015.
- Abad P & Williamson VM (2010). Plant Nematode Interaction: A Sophisticated Dialogue. *Adv. Bot. Res.* **53**: 147-192.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, and Ecker JR (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657.
- Alonso-Blanco C, Peeters AJ, Koornneef M, Lister C, Dean C, van den Bosch N, Pot J and Kuiper MT (1998). Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *Plant J.* **14**: 259-271.
- Alonso-Blanco C & Koornneef M (2000). Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends Plant Sci.* **5**: 22-29.
- Alonso-Blanco C, Aarts MGM, Bentsink L, Keurentjes JB, Reymond M, Vreugdenhil D and Koornneef M (2009). What has natural variation taught us about plant development, physiology, and adaptation? *Plant Cell* **21**: 1877-1896.
- Al-Shehbaz I & O'Kane (2002). Taxonomy and phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). In: the *Arabidopsis* book, American Society of plant Biologists Ed., <http://aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Ammati M, Thomason IJ and Roberts PA (1985). Screening *Lycopersicon spp.* for new genes imparting resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*). *Plant Dis.* **69**: 112-115.
- Ammiraju JSS, Veremis JC, Huang X, Roberts PA and Kaloshian I (2003). The heat-stable root-knot nematode resistance gene *Mi-9* from *Lycopersicon peruvianum* is localized on the short arm of chromosome 6. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 478-484.
- Anderson RM (1976). Seasonal variation in the population dynamics of *Caryophyllaeus laticeps*. *Parasitology*, **72**: 281-305.
- Anderson RM & Michel JF (1977). Density dependent survival in populations of *Ostertagia ostertagi*. *Int. J. Parasitol.* **7**: 321-329.
- Anderson RM & May RM (1978). Regulation and stability of host parasite population interactions. I. Regulatory processes. *J. Anim. Ecol.* **47**: 219-247.
- Arelli PR, Concibido VC and Young LD (2010). QTLs associated with resistance in soybean PI567516C to synthetic nematode population infecting cv. Hartwig. *J. Crop Sci. Biotech.* **13**: 163-167.
- Arriagada O, Mora F, Dellarossa JC, Ferreira MFS, Cervigni GDL and Schuster I (2012). Bayesian mapping of quantitative trait loci (QTL) controlling soybean cyst nematode resistant. *Euphytica* **186**: 907-917.
- Ashworth ST, Kennedy CR and Blanc G (1996). Density-dependent effects of *Anguillicola crassus* (Nematoda) within and on its copepod intermediate hosts. *Parasitology* **113**: 303-309.
- Badra T, Salem MA and Oteifa BA (1979). Nematicidal activity of some organic fertilizers and soil amendments. *Revue de Nématol.* **2**: 29-36.
- Barcala M, Garcia A, Cabrera J, Casson S, Lindsey K, Favery B, Garcia-Casado G, Solano R, Fenoll C and Escobar C (2010). Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *Plant J.* **61**: 698-712.
- Barker KR (1991). Rotation and cropping systems for nematode control: The North Carolina experience-Introduction. *J. Nematol.* **23**: 342-343.
- Barone A, Ritter E, Schachtschnabel U, Debener T, Salamini F and Gebhardt C (1990). Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 177-182.

- Bar-Or C, Kapulnik Y and Koltai H (2005). A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Eur. J. Plant Pathol.* **111**: 181-192.
- Barthels N, van der Lee FM, Klap J, Goddijn OJ, Karimi M, Puzio P, Grundler FM, Ohl SA, Lindsey K, Robertson L, Robertson WM, Van Montagu M, Gheysen G and Sijmons PC (1997). Regulatory sequences of Arabidopsis drive reporter gene expression in nematode feeding structures. *Plant Cell* **9**: 2119-2134.
- Bednarek P, Piślewska-Bednarek M, Svatoš A, Schneider B, Doubsky J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, Molina A and Schulze-Lefert P (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* **323**: 101–106.
- Bélair G (2005). Les nématodes, ces anguillules qui font suer les plantes par la racine. *Phytoprotection* **86**: 65-69.
- Benjamini Y & Hochberg Y (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B. Met.* **57**: 289-300.
- Bird AF & Brisbane PG (1988). The influence of *Pasteuria penetrans* in field soils on the reproduction of root-knot nematodes. *Revue Nématol.* **11**: 75-81.
- Bird DM, Opperman CH and Davies KG (2003). Interactions between bacteria and plant-parasitic nematodes: now and then. *Int. J. Parasitol.* **33**: 1269-1276.
- Bird DM & Wilson MA (1994). DNA sequence and expression analysis of root-knot nematode-elicited giant cell transcripts. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**: 419-424.
- Boiteux LS, Fonseca MEN and Simon PW (1999). Host status and reaction of *Arabidopsis thaliana* ecotypes to infection by the northern root-knot nematode (*Meloidogyne hapla*). *Plant Breeding* **118**: 355-358.
- Boiteux LS, Belter JG, Roberts PA and Simon PW (2000). RAPD linkage map of the genomic region encompassing the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance locus in carrot. *Theor. Appl. Genet.* **100**: 439-446.
- Bouchez D (2004). L'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*. In: Briat J F & Morot-Gaudry JF (Eds.) La génomique en biologie végétale. INRA Editions, pp. 289-301.
- Bradley DJ (1971). Inhibition of *Leishmania donovani* reproduction during chronic infections in mice. *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.* **65**: 17-18.
- Braga R, Labrada R, Fornasari L and Fratini N (2001). Des alternatives au bromure de méthyle pour la fumigation du sol. Manuel de formation pour les vulgarisations et les paysans. Unité Energie et Action de l'ozone. Programme des Nations Unies pour l'environnement. Organisation des Nations Unies pour l'agriculture et l'alimentation. Rome, pp. 59-60.
- Braham WS & Sasser JN (1956). Root-knot nematode resistance in tomato. *Proc. Assoc. South. Agric. Work.* **53**: 175-176.
- Bridge J (1987). Control strategies in subsistence agriculture. In: Brown RH & Kerry BR (eds.) Principles and Practice of Nematode Control in Crops. Academic Press, New York, pp. 389-420.
- Bridge J, Plowright RA and Peng D (2005). Nematode parasites of rice. In: Luc M, Sikora RA and Bridge J (Eds.) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CABI Publishing, pp. 87-118.
- Broman KW, Wu H, Sen S and Churchill GA (2003). R/qtl : QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* **19**: 889-890.
- Brown CR, Yang CP, Mojtahedi H, Santo GS and Masuelli R (1996). RFLP analysis of resistance to Columbia root-knot nematode derived from *Solanum bulbocastanum* in a BC2 population. *Theor. Appl. Genet.* **92**: 572–576.
- Brown SM, Kepner JL, and Smart GC, (1985). Increased crop yields following application of *Bacillus penetrans* to field plots infested with *Meloidogyne incognita*. *Soil Biol. Biochem.* **17**: 483-486.
- Brueske CH (1980). Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato roots infected and resistant to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiol. Plant Pathol.* **16**: 409-414.
- Bryan J, McLean K, Bradshaw E, De Jong S, Phillips M, Castelli L and Waugh R (2002). Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. *Theor. Appl. Genet.* **105**: 68-77.
- Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff HJ, Sandal NN, Marcker KA, Klein-Lankhorst RM, Salentijn EMJ, Lange W, Stiekema WJ, Wyss U, Grundler FMW and Jung C (1997). Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* **275**: 832-834.
- Caillaud MC, Lecomte P, Jammes F, Quentin M, Pagnotta S, Andrio E, de Almeida-Engler J, Marfaing N, Gounon P, Abad P and Favery B (2008). MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 423-437.

- Cayrol JC, Djian-Caporalino C and Panchaud-Mattei E (1992). La lutte biologique contre les nématodes phytoparasites. *Courrier de la Cellule Environnement de l'INRA* **17**: 31-44.
- Cayrol JC (1981). Nouvel agent nématophage et procédé pour maîtriser la croissance des nématodes du genre méloidogyne. Brevet EP0006382 B1.
- Cebolla A, Vinardell JM, Kiss E, Olah B, Roudier F, Kondorosi A and Kondorosi E (1999). The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J.* **18**: 4476-4484.
- Cervantes-Fores JC, Yencho GC, Pecota KV, Sosinski B and Mwanga ROM (2008). Detection of quantitative trait loci and inheritance of root-knot nematode resistance in sweetpotato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **133**: 844-851.
- Chang W, Dong L, Wang Z, Hu H, Han Y, Teng W, Zhang H, Guo M and Li W (2011). QTL underlying resistance to two HG types of *Heterodera glycines* found in soybean cultivar 'L-10'. *BMC Genomics* **12**: 233.
- Channer AGDR & Gowen SR (1992). Selection for increased host resistance and increased pathogen specificity in the *Meloidogyne–Pasteuria penetrans* interaction. *Fund. Appl. Nematol.* **15**: 331-339.
- Chen R, Li H, Zhang L, Zhang J, Xiao J and Ye Z (2007). CaMi, a rootknot nematode resistance gene from hot pepper (*Capsium annuum* L.) confers nematode resistance in tomato. *Plant Cell Rep.* **26**: 895-905.
- Chitwood BG (1949). Root-knot nematodes I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *P. Helm. Soc. Wash.* **16**: 90-104.
- Chitwood DJ (2003). Nematicides. *In*: Wiley John & Sons (Eds.) *Encyclopedia of Agrochemicals* (3), New York, NY, pp. 1104-1115.
- Chitwood DJ & Perry RN (2010). Reproduction, physiology and biochemistry. *In*: Perry RN, Moens M, and Starr JL (Eds.) *Root-Knot nematodes*. 1st edition, CABI publishing, pp. 182-194.
- Claverie M, Dirlwanger E, Cosson P, Bosselut N, Lecouls AC, Voisin R, Kleinhentz M, Lafargue B, Caboche M, Chalhoub B and Esmenjaud D (2004). High-resolution mapping and chromosome landing at the root-knot nematode resistance locus *Ma* from Myrobalan plum using a large-insert BAC DNA library. *Theor. Appl. Genet.* **109**: 1318-1327.
- Claverie M, Dirlwanger E, Bosselut N, Van Ghelder C, Voisin R, Kleinhentz M, Lafargue B, Abad P, Rosso MN, Chalhoub B and Esmenjaud D (2011). The *Ma* gene for complete-spectrum resistance to *Meloidogyne* species in *Prunus* is a TNL with a huge repeated C-terminal post-LRR region. *Plant Physiol.* **156**: 779-792.
- Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G and Ausubel FM (2009). Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science* **323**: 95–101.
- Cobb NA (1919). The orders and classes of nemas. *Contrib. Sci. Nematol.* **8**: 213-216.
- Collard BCY, Jahufer MZM, Brouwer JB and Pang ECK (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* **142**: 169-196.
- Concibido VC, Diers BW and Arelli PR (2004). A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. *Crop Sci.* **44**: 1121-1131.
- Cook R & Evans K (1987). Resistance and tolerance. *In*: Brown RH & Kerry BR (eds.) *Principles and practice of nematode control in crops*. Academic Press, New York, pp. 179-221.
- Cook DE, Lee TG, Guo X, Melito S, Wang K, Bayless AM, Wang J, Hughes TJ, Willis DK, Clemente TE, Diers BW, Jiang J, Hudson ME and Bent AF (2012). Copy number variation of multiple genes at *Rhg1* mediates nematode resistance in soybean. *Science* **338**: 1206-1209.
- Cottage A, Mullan L, Portela MBD, Hellen E, Carver T, Patel S, Vavouri T, Elgar G and Edwards YJK (2004). Molecular characterization of the SAND protein family: a study based on comparative genomics, structural bioinformatics and phylogeny. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **9**: 739-753.
- Coyne DL, Nicol JM et Claudius-Cole B (2010). Les nématodes des plantes: Un guide pratique des techniques de terrain et de laboratoire. Secrétariat SP-IPM, Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA), Cotonou, Benin, pp. 3-9. Edition traduit par Quénéhervé P.
- Croll NA & Viglierchio DR (1969). Reversible inhibition of chemosensitivity in a phytoparasitic nematode. *J. Parasitol.* **55**: 895-896.
- Czechoski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK and Scheible WR (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **139**: 5-17.
- Davies KG, Kerry BR and Flynn CA (1988). Observations on the pathogenecity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. *Ann. Appl. Biol.* **112**: 491-501.

- Davies KG & Spiegel Y (2011). Biological control of plant-parasitic nematodes: towards understanding field variation through molecular mechanisms. *In*: Jones J., Gheysen G. and Fenoll C. (Eds.) Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions. Springer publishers, pp. 493-509.
- Davis EL, Hussey RS, Baum TJ, Bakker J and Schots A (2000). Nematode parasitism genes. *Ann. Rev. Phytopath.* **38**: 365-396.
- Daykin ME & Hussey RS (1985). Staining and histo-pathological techniques in nematology. *In*: Barker KR, Carter CC, and Sasser JN (eds). An Advanced Treatise on Meloidogyne. Volume II. Raleigh, NC: North Carolina State University Graphics, pp. 39-48.
- de Almeida Engler J, De Vleeschauwer V, Burssens S, Celenza JL Jr, Inzé D, Van Montagu M, Engler G and Gheysen G (1999). Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. *Plant Cell* **11**: 793-807.
- de Almeida Engler J, Kyndt T, Vieira O, Van Cappelle E, Boudolf V, Sanchez V, Escobar C, De Veylder L, Engler G, Abad P and Gheysen G (2012). *CCS52* and *DEL1* genes are key components of the endocycle in nematode-induced feeding sites. *Plant J.* **72**: 185-198.
- deLeij FAAM, Kerry BR and Dennehy JA (1993). *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot tests. *Nematologica* **39**: 115-126.
- De Jin R, Suh JW, Park RD, Kim YW, Krishnan HB and Kim KY (2005). Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Nematology* **7**: 125-132.
- De Veylder L, Larkin JC and Schnittger A, (2011). Molecular control and function of endoreduplication in development and physiology. *Trends Plant Sci.* **16**: 1360-1385.
- De Waele D & David RG (1998). Nématodes à galles des bananiers et plantains. Parasites et ravageurs des *Musa* : fiche technique n° 3. INIBAP. Réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain, Montpellier, France, pp. 1-4.
- Dirk DW & Romulo GD (1998). Parasites et ravageurs des *Musa* - Nématodes à galle des bananiers et plantains. Fiche technique n°3.
- Di Vito M, Greco N and Carella A (1986). Effect of *Meloidogyne incognita* and importance of the inoculum on the yield of eggplant. *J. Nematol.* **18**: 487-490.
- Di Vito M, Vovlas N and Castillo P (2004). Host-parasite relationships of *Meloidogyne incognita* on spinach. *Plant Pathol.* **53**: 508-514.
- Djian-Caporalino C, Pijarowski L, Fazari A, Samson M, Gaveau L, O'Byrne C, Lefebvre V, Caranta C, Palloix A and Abad P (2001). High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci *Me3* and *Me4* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theor. Appl. Genet.* **103**: 592-600.
- Djian-Caporalino C, Fazari A, Arguel MJ, Vernie T VandeCastele C, Faure I, Brunoud G, Pijarowski L, Palloix A, Lefebvre V and Abad P (2007). Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theor. Appl. Genet.* **114**: 473-486.
- Doyle EA & Lambert KN (2003). *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**: 123-131.
- Dropkin VH, Martin GC & Johnson RW (1958). Effect of osmotic concentration on hatching of some plant parasitic nematodes. *Nematologica* **3**: 115-126.
- Dropkin VH (1969). The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology* **59**: 1632-1637.
- Duval J (1993). Les plantes nématicides. Agrobio 360-04. EAP Publications. McGill University, Canada.
- Ebert D, Zschokke-Rohringer CD and Carius HJ (2000). Dose effects and density-dependent regulation of two microparasites of *Daphnia magna*. *Oecologia* **122**: 200-209.
- Edmunds JE & Mai WF (1967). Effect of *Fusarium oxysporum* on movement of *Pratylenchus penetrans* toward alfalfa roots. *Phytopathology* **57**: 468-471.
- Eisenback JD & Triantaphyllou HH (1991). Root-knot Nematodes: *Meloidogyne* species and races. *In*: Nickle WR (ed). Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 281-286.
- Ellis J, Dodds P and Pryor T (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 278-284.
- Ellis PR & Maxon-Smith JW (1971). Inheritance of resistance to potato cyst-eelworm (*Heterodera rostochiensis* Woll.) in the genus *Lycopersicon*. *Euphytica* **20**: 93-101.

- El-Lithy ME, Bentsink L, Hanhart CJ, Ruys G J, Rovito D, Broekhof JLM, Van der Poel HJA, Van Eijk M JT, Vreugdenhil D and Koornneef M (2006). New Arabidopsis recombinant inbred line populations genotyped using SNPWave and their use for mapping flowering-time quantitative trait loci. *Genetics* **172**: 1867-1876.
- El-sherif M & Mai WF (1969). Thermotactic response of some plant parasitic nematodes. *J. Nematol.* **1**: 43-48.
- Ernst K, Kumar A, Kriseleit D, Kloos DU, Phillips MS and Ganai MW (2002). The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (*Hero*) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. *Plant J.* **31**, 127-136.
- Escobar C, Barcala M, Portillo M, Almoguera C, Jordano J and Fenoll C (2003). Induction of the *Hahsp17.7G4* promoter by root knot nematodes: involvement of heat-shock elements in promoter activity in giant cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**: 1062-1068.
- Esmenjaud D, Minot JC, Voisin R, Pinochet J and Salesses G (1994). Inter- and intraspecific resistance variability in Myrobalan plum, peach and peach-almond rootstocks using 22 root-knot nematode populations. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **119**: 94-100.
- Esmenjaud D, Minot JC, Voisin R, Bonnet A and Salesses G (1996). Inheritance of resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria* in Myrobalan plum. *Theor. Appl. Genet.* **92**: 873-879.
- Evans K (1969). Apparatus for measuring nematode movement. *Nematologica* **15**: 433-435.
- Falconer DS & Mackay TF C (1996). Introduction to Quantitative Genetics, 4th ed. Pearson education Limited, Prentice Hall, UK, pp. 356-377.
- Favery B, Lecomte P, Gil N, Bechtold N, Bouchez D, Dalmasso A, and Abad P (1998). *RPE*, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. *EMBO J.* **17**, 6799-6811.
- Favery B, Complainville A, Vinardell JM, Lecomte P, Vaubert D, Mergaert P, Kondorosi A, Kondorosi E, Crespi M and Abad P (2002). The endosymbiosis-induced genes *ENOD40* and *CCS52a* are involved in endoparasitic nematode interactions in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**: 1008-1013.
- Finkers R, van den Berg P, van Berloo R, ten Have A, van Heusden AW, van Kan JAL and Lindhout P (2007). Three QTLs for *Botrytis cinerea* resistance in tomato. *Theor. Appl. Genet.* **114**: 585-593.
- Fould S, Ndiaye-Faye N, Normand P and Mateille T (2000). Détection de *Pasteuria penetrans sensu lato*, bactérie parasite des nématodes telluriques, dans les jachères en zone sahélienne. *In*: Herbillon A, Feller C and Eimberck M (eds.) Biofonctionnements des sols tropicaux et mode de gestion de terres. *Étude et Gestion des Sols* Vol 7, pp. 279-286.
- Fourie H, Mienie CMS, McDonald AH and De Waele D (2008). Identification and validation of genetic markers associated with *Meloidogyne incognita* race 2 resistance in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Nematology* **10**: 651-661.
- Fuller VL, Lilley CJ, Atkinson HJ and Urwin PE (2007). Differential gene expression in Arabidopsis following infection by plant-parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 595-609.
- Fuller VL, Lilley CJ and Urwin PE (2008). Nematode resistance. *New Phytologist* **180**: 27-44.
- Galal A, Sharma S, Abou-Elwafa SF, Sharma S, Kopisch-Obuch F, Laubach E, Perovic D, Ordon F and Jung C (2014). Comparative QTL analysis of root lesion nematode resistance in barley. *Theor. Appl. Genet.* **127**: 1399-1407.
- Ganai MW, Simon R, Brommonschenkel S, Arndt M, Phillips MS, Tanksley SD and Kumar A (1995). Genetic mapping of a wide spectrum nematode resistance gene (*Hero*) against *Globodera rostochiensis* in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 886-891.
- Garcia GM, Stalker HT, Shroeder E and Kochert G (1996). Identification of RAPD, SCAR and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. *Genome* **39**: 836-845.
- Gaur HS, Beane J and Perry RN (2000). The influence of root diffusate, host age and water regimes on hatching of the root-knot nematode *Meloidogyne triticroyzae*. *Nematology* **2**: 191-199.
- Gebhardt C, Mugniery D, Ritter E, Salamini F and Bonnel E (1993). Identification of RFLP markers closely linked to the *H1* gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 541-544.
- Gheysen G & Fenoll C (2002). Gene expression in nematode feeding sites. *Annu. Rev. Phytopathology* **40**: 191-219.
- Gheysen L & Jones JT (2006). Molecular aspects of plant-nematode interactions. *In*: Perry RN, Moens M (Eds.) Plant nematology. CABI Publishing, Wallingford, pp. 234-254.

- Gheysen G & Fenoll C (2011). *Arabidopsis* as a tool for the study of plant-nematode interactions. **In:** Jones J, Gheysen G and Fenoll C (Eds.) Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions. Springer, pp. 139-152.
- Gilbert JG & McGuire DC (1955). Inheritance of resistance to severe root-knot from *Meloidogyne incognita* in commercial type tomatos. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* **63**: 437-442.
- Goddijn OJ, Lindsey K, van der Lee FM, Klap JC and Sijmons PC (1993). Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harbouring promoter-*gusA* fusion constructs. *Plant J.* **4**: 863-873.
- Godoy G, Rodriguez-Käbana R and Morgan-Jones G (1983a). Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in an Alabama soil. A mycological survey and greenhouse studies. *Nematropica* **13**: 201-213.
- Godoy G, Rodriguez-Käbana R, Shelby RA and Morgan-Jones G (1983b). Chitin amendments for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. II. Effects on microbial opulation. *Nematropica* **13**: 63-74.
- Goellner M, Smant G, De Boer JM, Baum TJ and Davis EL (2000). Isolation of β -1,4-endoglucanase genes from *Globodera tabacum* and their expression during parasitism. *J. Nematol.* **32**: 154-165.
- Goellner M, Wang X and Davis EL (2001). Endo- β -1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interaction. *Plant Cell* **13**: 2241-2255.
- Goverse A, Bieshieuvel J, Wijers GJ, Gommers FJ, Bakker J, Schots A and Helder J (1998). *In planta* monitoring of the activity of two constitutive promoters, CaMV 35S and TR20, in developing feeding cells induced by *Globodera rostochiensis* using green fluorescent protein in combination with confocal laser scanning microscopy. *Phys. Mol. Plant Path.* **52**: 275-284.
- Gowen SR & Ahmed R (1990). *Pasteuria penetrans* for control of pathogenic nematodes. *Asp. Appl. Biol.* **24**: 25-31.
- Gowen SR & Tzortzakakis EA, (1994). Biological control of *Meloidogyne spp*, with *Pasteuria penetrans*. *EPPO Bull.* **24**: 495-500.
- Guet G (1999). Mémento d'agriculture biologique, guide pratique à usage professionnel. Editions Agridécisions, Groupe France agricole, Paris, France, pp. 189-192.
- Guiran DG & Netscher C (1970). Les nématodes du genre *Meloidogyne*, parasites de cultures tropicales. *Cah. ORSTOM, Sér. Biol.* **11**: 151-182.
- Guo B, Slepser DA, Lua P, Shannon JG, Nguyen HT and Arelli PR (2005). QTLs associated with resistance to soybean cyst nematode in soybean: Meta-analysis of QTL locations. *Crop Sci.* **46**: 595-602.
- Gurr SJ, McPherson MJ, Scollan C, Atkinson HJ and Bowles DJ (1991). Gene expression in nematode-infected plant roots. *Mol. Gen. Genet.* **226**: 361-366.
- Gustafson DI (1993). Developing "environmentally friendly" pesticides. **In:** Gustafson DI (ed.), Pesticides in Drinking Water. Chapel Hill, NC, US, pp. 183-193.
- Ha BK, Hussey RS and Boerma HR (2007). Development of SNP assays for marker-assisted selection of two southern root-knot nematode resistance QTL in soybean. *Crop Sci.* **47**: S73-S82.
- Hague NGM & Gowen SR (1987). Chemical control of nematodes. **In:** Brown RH and Kerry BR (eds.) Principles and Practice of Nematode Control. Academic Press, New York, pp. 131-173.
- Haley CS & Knott SA (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* **69**: 315-324.
- Hammes UZ, Schachtman DP, Berg RH, Nielsen E, Koch W, McIntyre LM and Taylor CG (2005). Nematode-induced changes of transporter gene expression in *Arabidopsis* roots. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**: 1247-1257.
- Hammond-Kosack KE & Jones JDG (1997). Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 575-607.
- Hammond-Kosack KE & Kanyuka K (2007). Resistance genes (*R* genes) in plants. eLS: DOI: 10.1002/9780470015902.a0020119.
- Handoo ZA, Nyczepir AP, Esmenjaud D, van der Beek JG, Castagnone-Sereno P, Carta LK, Skantar AM and Higgins JA (2004). Morphological, molecular, and differential host characterization of *Meloidogyne floridensis* n. sp (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing peach in Florida. *J. Nematol.* **36**: 20-35.
- Haubold B, Kroymann J, Ratzka A, Mitchell-Olds T and Wiehe T (2002). Recombination and gene conversion in a 170-kb genomic region of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **161**: 1269-1278.

- He Y, Kumar P, Shen X, Davis RF, Van Becelaere G, May OL, Nichols RL and Chee PW (2014). Re-evaluation of the inheritance for root-knot nematode resistance in the Upland cotton germplasm line M-120 RNR revealed two epistatic QTLs conferring resistance. *Theor. Appl. Genet.* **127**: 1343-1351.
- Heijbroek W, Roelands AJ, De Jong JH, Van Hulst C, Schoone AHL and Munning RG (1988). Sugar beets homozygous for resistance to beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.), developed from monosomic additions of *Beta procumbens* to *B. vulgaris*. *Euphytica* **38**: 121-131.
- Heller R, Schondelmaier J, Steinrucken G and Jung C (1996). Genetic localization of four genes for nematode (*Heterodera schachtii* Schm) resistance in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* **92**: 991-997.
- Hermsmeier D, Mazarei M and Baum TJ (1998). Differential display analysis of the early compatible interaction between soybean and soybean cyst nematode. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 1258-1263.
- Hermsmeier D, Hart JK, Byzova M, Rodermeel SR and Baum TJ (2000). Changes in mRNA abundance within *Heterodera schachtii*-infected roots of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 309-315.
- Hewezi T, Maier TR, Nettleton D, and Baum TJ (2012). The Arabidopsis MicroRNA396-GRF1/GRF3 Regulatory Module Acts as a Developmental Regulator in the Reprogramming of Root Cells during Cyst Nematode Infection. *Plant Physiol.* **159**: 321-335.
- Heyndrickx KL & Vandepoele K (2012). Systematic identification of functional plant modules through the integration of complementary data sources. *Plant Physiol.* **159**: 884-901.
- Huang BE, George AW, Forrest KL, Kilian A, Hayden MJ, Morell MK and Cavanagh CR (2012). A multiparent advanced generation inter-cross population for genetic analysis in wheat. *Plant Biotech. J.* **10**: 826-839.
- Huang CS (1985). Formation, anatomy and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. *In*: Sasser JN & Carter CC (Eds.) *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Vol. 1, North Carolina State University Graphics, pp. 155-164.
- Huang SP & Pereira AC (1994). Influence of inoculum density, host, and low-temperature period on delayed hatch of *Meloidogyne javanica* eggs. *J. Nematol.* **26**: 72-75.
- Hunt DJ, Luc M and Manzanilla-Lopez RH (2005). Identification, morphology and biology of plant-parasitic nematodes. *In*: Luc M, Sikora RA and Bridge J (Eds.) *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CABI Publishing, pp. 11-80.
- Hussey RS & Grundler FMW (1998). Nematode parasitism of plants. *In*: Perry RN (Ed.) *The Physiology and Biochemistry of Free-Living and Plant-Parasitic Nematodes*. CABI, Wallingford, pp. 213-243.
- Hutchinson CM, McGiffen ME J, Ohr HD, Sims JJ and Becker JO (1999). Evaluation of methyl iodide as a soil fumigant for root-knot nematode control in carrot production. *Plant Dis.* **83**: 33-36.
- Ibrahim IKA & Hollis JP (1967). Nematode orientation mechanisms. I. A method for determination. *Phytopathology* **57**: 816.
- Jacobs JME, van Eck HJ, Horsman K, Arens PFP, Verkerk-Bakker B, Jacobsen E, Pereira A and Stiekema WJ (1996). Mapping of resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from the wild potato species *Solanum vernei*. *Mol. Breed.* **2**: 51-60.
- Jaffee BA & Zehr EI (1982). Parasitism of the nematode *Criconebella xenoplax* by the fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *Phytopathol.* **72**: 1378-1381.
- Jairajpuri MS & Azmi MI (1978). Aggregation and repulsion of nematodes at pH gradients. *Nematol. med.* **6**: 107-112.
- Jammes F, Lecomte P, de Almeida-Engler J, Bitton F, Martin-Magniette ML, Renou JP, Abad P and Favery B (2005). Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. *Plant J.* **44**: 447-58.
- Jander G, Cui J, Nhan B, Pierce NE and Ausubel FM (2001). The *TASTY* locus on chromosome 1 of Arabidopsis affects feeding of the insect herbivore *Trichoplusia ni*. *Plant Physiol.* **126**: 890-898.
- Janssen WG, Norel Van A, Verkerk-Bakker B and Janssen R (1997). Intra and interspecific variation of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., with regard to resistance in wild tuber-bearing *Solanum* species. *Fund. App. Nematol.* **20**: 449-457.
- Jatala P, Kaltenbach R and Bocangel M (1979). Biological control of *Meloidogyne incognita* acrita and *Globodera pallida* on potatoes. *J. Nematol.* **11**: 303.
- Jaubert S, Laffaire JB, Abad P and Rosso MN (2002). A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *FEBS Lett.* **522**: 109-112.

- Jayatilake DV, Tucker EJ, Bariana H, Kuchel H, Edwards J, McKay AC, Chalmers K and Mather DE (2013). Genetic mapping and marker development for resistance of wheat against the root lesion nematode *Pratylenchus neglectus*. *BMC Plant Biol.* **13**: 230.
- Jin J, Hewezi T and Baum TJ (2011). The Arabidopsis bHLH25 and bHLH27 transcription factors contribute to susceptibility to the cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Plant J.* **65**: 319-328.
- Johnson AW (1982). Managing nematode populations in crop production. *In*: Riggs RD (ed.) Nematology in the southern region of the United States, University of Arkansas, pp. 193-203.
- Johnson AW & Fassuliotis G (1984). Nematode parasites of vegetable crops. *In*: Nickle WR (ed.) Plant and Insect Nematodes. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 323-372.
- Johnson RN & Viglierchio DR (1961). The accumulation of plant parasitic nematode larvae around carbon dioxide and oxygen. *Proc. helminth. Soc. Wash.* **28**: 171-174.
- Jones MGK & Dropkin VH, (1976). Scanning electron microscopy of nematode-induced giant transfer cells. *Cytobios.* **15**: 149-161.
- Jung C & Wricke G (1987). Selection of diploid nematode-resistant sugar beet from monosomic addition lines. *Plant Breed.* **98**: 205-214.
- Kanwar RS & Bhatti DS (1993). Management of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) by poor host crops in three crop rotations. *Int.J. Pest Manage.* **39**: 304-308.
- Kearsley MJ (1998). The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *J. Exp. Bot.* **49**: 1619-1623.
- Kerry BR & Deleu F (1991). New nematocidal strain of *Verticillium chlamydosporium* for control of *Meloidogyne spp.*, well maintained in soil without damage to plants. Brevet WO9101642 (A1).
- Kerry BR, Simon A and Rovira AD (1984). Observations on the introduction of *Verticilliumchlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst-nematode *Heterodera avenae*. *Ann. Appl. Biol.* **104**: 509-516.
- Keymer AE (1982). Density-dependence mechanisms in the regulation of intestinal helminth populations. *Parasitology* **84**: 573-587.
- Kiewnick S & Sikora RA (2006). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biol. Control* **38**: 179-187.
- Kim HS & Diers BW (2000). Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. *Crop Sci.* **40**: 55-61.
- Klein-Lankhorst R, Rietveld P, Machiels B, Verkerk R, Weide R, Gebhardt C, Koornneef M and Zabel P (1991). RFLP markers linked to the root-knot nematode resistance gene *Mi* in tomato. *Theor. Appl. Genet.* **81**: 661-667.
- Kliebenstein DJ, Pedersen D and Mitchell-Olds T (2002). Comparative analysis of insect resistance QTL and QTL controlling the myrosinase/glucosinolate system in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **161**: 325-332.
- Klingler J (1972). The effect of single and combined heat and CO₂ stimuli at different ambient temperatures on the behavior of two plant-parasitic nematodes. *J. Nematol.* **4**: 95-10.
- Koltai H, Dhandaydham M, Opperman C, Thomas J and Bird D (2001). Overlapping plant signal transduction pathways induced by a parasitic nematode and a rhizobial endosymbiont. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 1168-1177.
- Koornneef M, Alonso-Blanco C and Vreugdenhil D (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 141-172.
- Kouassi AB, Kerlan MC, Caromel B, Dantec JP, Fouville D, Manzanares-Dauleux M, Ellissèche D and Mugniéry D (2006). A major gene mapped on chromosome XII is the main factor of a quantitatively inherited resistance to *Meloidogyne fallax* in *Solanum sparsipilum*. *Theor. Appl. Genet.* **112**: 699–707.
- Kover PX, Valdar W, Trakalo J, Scarcelli N, Ehrenreich IM, Purugganan MD, Durrant C and Mott R (2009). A multiparent advanced generation inter-Cross to fine-map quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genet.* **5**: e1000551.
- Kreike CM, De Koning JRA, Vinke JH, Van Ooijen JW and Stiekema WJ (1994). Quantitatively inherited resistance to *Globodera pallida* is dominated by one major locus in *Solanum spegazzinii*. *Theor. Appl. Genet.* **88**: 764-769.
- Kroymann J, Donnerhacke S, Schnabelrauch D and Mitchell-Olds T (2003). Evolutionary dynamics of an Arabidopsis insect resistance quantitative trait locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 14587-14592.
- Kroymann J & Mitchell-Olds T (2005). Epistasis and balanced polymorphism influencing complex trait variation. *Nature* **435**: 95-98.

- Lambert KN, Allen KD and Sussex IM (1999). Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific chorismate mutase from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 328–336.
- Lambrix VM, Reichelt M, Mitchell-Olds T, Kliebenstein DJ and Gershenzon J (2001). The Arabidopsis epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *Plant Cell* **13**: 2793-2807.
- Lammens T, Boudolf V, Kheibarshekan L, Zalmas LB, Gaamouche T, Maes S, Vanstraelen M, Kondorosi E, La Thanque NB, Govaerts W, Inzé D and De Veylder L (2008). Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function obligatory for endocycle onset. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 14721-14726.
- Lecouls AC, Rubio-Cabetas MJ, Minot JC, Voisin R, Bonnet A, Saleses G, Dirlewanger E and Esmenjaud D (1999). RAPD and SCAR markers linked to the *Ma1* root-knot nematode resistance gene in Myrobalan plum (*Prunus cerasifera* Her.). *Theor. Appl. Genet.* **99**: 328-336.
- Lecouls AC, Bergougnoux V, Rubio-Cabetas MJ, Bosselut N, Voisin R, Poessel JL, Faurobert M, Bonnet A, Saleses G, Dirlewanger E and Esmenjaud D (2004). Marker-assisted selection for the wide-spectrum resistance to root-knot nematodes conferred by the *Ma* gene from Myrobalan plum (*Prunus cerasifera*) in interspecific *Prunus* material. *Mol. Breed.* **13**: 113-124.
- Li Z, Jakkula L, Hussey RS, Tamulonis JP and Boerma HR (2001). SSR mapping and confirmation of the QTL from PI96354 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. *Theor. Appl. Genet.* **103**: 1167-1173.
- Linford MB (1937). The feeding of the root-knot nematode in root tissue and in nutrient solution. *Phytopathology* **27**: 824-835.
- Linford MB (1942). The transient feeding of root-knot nematode larvae. *Phytopathology* **32**: 580-589.
- Linsell KJ, Rahman MS, Taylor JD, Davey RS, Gogel BJ, Wallwork H, Forrest KL, Hayden MJ, Taylor SP and Oldach KH (2014). QTL for resistance to root lesion nematode (*Pratylenchus thornei*) from a synthetic hexaploid wheat source. *Theor. Appl. Genet.* **127**: 1409-1421.
- Lisek J, Meyer RC, Steinfath M, Redestig H, Becher M, Witucka-Wall H, Fiehn O, Törjek O, Selbig J, Altmann T and Willmiter L (2008). Identification of metabolic and biomass QTL in Arabidopsis thaliana in a parallel analysis of RIL and IL populations. *Plant J.* **53**: 960-972.
- Lister C & Dean C (1993). Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic markers in Arabidopsis thaliana. *The Plant J.* **4**: 745-750.
- Liu S, Kandoth PK, Warren SD, Yeckel G, Heinz R, Alden J, Yang C, Jamai A, El-Mellouki T, Juvalé PS, Hill J, Baum TJ, Cianzio S, Whitham SA, Korkin D, Mitchum MG and Meksem K (2012). A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature* **492**: 256-260.
- Llorente F, Alonso-Blanco C, Sanchez-Rodriguez C, Jorda L and Molina A (2005). ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from Arabidopsis are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J.* **43**: 165-180.
- Lohar DP, Schaff JE, Laskey JG, Kieber JJ, Bilyeu KD and Bird DM (2004). Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and rhizobial symbioses. *Plant J.* **38**: 203-214.
- Loudet O & Danial-Vedele F (2004). Dissection génétique d'un caractère complexe chez Arabidopsis : lignées recombinantes et recherche de QTL. In: Morot-Gaudry JF & Briat JF, (Eds.) La génomique en biologie végétale. INRA éditions, pp. 427-435.
- Loudet O, Chaillou S, Camilleri C, Bouchez D and Daniel-Vedele F (2002). Bay-0 x Shahdara recombinant inbred line population: a powerful tool for the genetic dissection of complex traits in Arabidopsis. *Theor. Appl. Genet.* **104**: 1173-1184.
- Lu ZX, Sossey-Alaoui K, Reighard GL, Baird WV and Abbott AG (1999). Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding. *Theor. Appl. Genet.* **99**: 115-113.
- Lu ZX, Reighard GL, Nyczepir AP, Beckman TG and Ramming DW (2000). Inheritance of resistance to root-knot nematodes in *Prunus* rootstocks. *Hort. Science* **35**: 1344-1346.
- Lynch M & Walsh B (1998). Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sunderland, MA, Sinauer Associates, Inc., pp. 431-477.
- Madulu J and Trudgill DL (1994). Influence of temperature on *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* **40**: 230-243.
- Mamta J, Mohapatra SL, Panda RS, Mohanty SK, Thatoi HN and Sahu SC (2013). Genetic loci associated with root-knot nematode resistance in rice cv. Ramakrishna. *Oryza* **50**: 132-139.

- Mahalingam R, Wang G and Knap HT (1999). Polygalacturonase and polygalacturonase inhibitor protein: gene isolation and transcription in Glycine max-*Heterodera glycines* interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**: 490-498.
- Maxwell JJ, Brick MA, Byrne PF, Schwartz HF, Shan X, Ogg BJ and Hensen RA (2007). Quantitative trait loci linked to white mold resistance in common bean. *Crop Sci.* **47**: 2285-2294.
- Mazarei M, Lennon KA, Puthoff DP, Rodermeel SR and Baum TJ (2003). Expression of an Arabidopsis phosphoglycerate mutase homologue is localized to apical meristems, regulated by hormones, and induced by sedentary plant-parasitic nematodes. *Plant Mol. Biol.* **53**: 513-530.
- McDonald AH & Nicol JM (2005). Nematode parasites of cereals. In: Luc M, Sikora RA and Bridge J (Eds.) *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CABI Publishing, pp. 131-172.
- McHale L, Tan X, Koehl P and Micheltmore RW (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology* **7**: 212.
- McKenry MV (1987). Control strategies in high value crops. In: Brown RH & Kerry BR (eds.) *Principles and practice of nematode control in crops*. Academic Press, New York, pp. 329-349.
- McSorley R (1999). Host suitability of potential cover crops for root-knot nematodes. *J. Nematol.* **31**: 619-623.
- Meksem K, Pantazopoulos P, Njiti VN, Hyten LD, Arelli PR and Lightfoot DA (2001). 'Forrest' resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the *rhg1* and *Rhg4* loci. *Theor. Appl. Genet.* **103**: 710-717.
- Messeguer R, Ganai M, de Vicente MC, Young ND, Bolkan H and Tanksley SD (1991). High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato. *Theor. Appl. Genet.* **82**: 529-536.
- Mian IH, Godoy G, Shelby RA, Rodriguez-Kabana R and Morgan-Jones G (1982). Chitin amendments for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. *Nematropica* **12**: 71-84.
- Michael E & Bundy DAP (1989). Density dependence in establishment, growth and worm fecundity in intestinal helminthiasis: the population biology of *Trichuris muris* (Nematoda) infection in CBA/Ca mice. *Parasitology* **98**: 451-458.
- Micic Z, Hahn V, Bauer E, Schon CC, Knapp SJ, Tang S and Mechinger AE (2004). QTL mapping of *Sclerotinia* midstalk-rot resistance in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **109**: 1474-1484.
- Milligan S, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P and Williamson VM (1998). The root-knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* **10**: 1307-1319.
- Mitchum M, Sukno S, Shani Z, Shoseyov O and Davis EL (2004). The promoter of the *Arabidopsis thaliana* cel1 Endo-1, 4- β -glucanase gene is differentially expressed in plant feeding cells induced by root-knot and cyst nematodes. *Mol. Plant Path.* **5**: 175-181.
- Mitreva-Dautova M, Roze E, Overmars H, de Graaff L, Schots A, Helder J, Goverse A, Bakker J and Smant G (2006). A symbiont-independent endo-1,4-beta-xylanase from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**: 521-529.
- Mojtahedi H, Santo GS and Pinkerton JN (1991). Efficacy of ethoprop on *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi* and enhanced biodegradation in soil. *J. Nematol.* **23**: 372-379.
- Morgante M & Olivier AM (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant J.* **3**: 175-182.
- Muller R and Gooch PS (1982). Organic amendments in nematode control. An examination of the literature. *Nematropica* **12**: 319-326.
- Mullin BA, Abawi GS and Pastor-Corrales MA (1991). Modification of resistance expression of *Phaseolus vulgaris* to *Meloidogyne incognita* by elevated soil temperatures. *J. Nematol.* **23**: 182-187.
- Nie P & Kennedy CR (1993). Infection dynamics of larval *Bothrioccephalus claviceps* in *Cyclops vicinus*. *Parasitology* **106**: 503-509.
- Niebel A, de Almeida Engler J, Hemerly A, Ferreira P, Inzé D, Van Montagu M and Gheysen G (1996). Induction of *cdc2a* and *cyc1At* expression in *Arabidopsis thaliana* during early phases of nematode-induced feeding cell formation. *Plant J.* **10**: 1037-1043.
- Noling JW & Becker JO (1994). The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. *J. Nematol.* **26**: 573-586.
- Omwega CO, Thomason IJ and Roberts PA (1990). Effect of temperature on expression of resistance to *Meloidogyne spp.* in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nematol.* **22**: 446-451.

- Opperman CH, Taylor CG and Conkling MA (1994). Root-knot nematode directed expression of a plant root-specific gene. *Science* **263**: 221-223.
- Overman AJ (1964). The effect of temperature and flooding on nematode survival in fallow sandy soil. *Soil Crop Sci. Soc. Fl.* **34**: 197-200.
- Paal J, Henselewski H, Muth J, Meksem K, Menendez CM, Salamini F, Ballvora A and Gebhardt C (2004). Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root nematode *Globodera rostochiensis*. *Plant J.* **38**: 285-287.
- Paulson RE & Webster JM (1972). Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiol. Plant Pathol.* **2**: 227-234.
- Pélissier T, Clavel M, Chaparro C, Pouch-Pélissier MN, Vaucheret H and Deragon JM (2011). Double-stranded RNA binding proteins DRB2 and DRB4 have an antagonistic impact on polymerase IV-dependant siRNA levels in *Arabidopsis*. *RNA* **17**: 1502-1510.
- Perry RN (2002). Hatching. *In*: Lee DL (ed.) *The biology of nematodes*. Taylor & Francis, London (UK) and New York (USA), pp. 147-169.
- Perry RN & Maule AG (2004). Physiological and biochemical basis of nematode behaviour. *In*: Gaugler R & Bilgrami A (Eds.) *Nematode behaviour*. CAB International, Wallingford, pp. 197-236.
- Perry RN & Moens M (2006). *Plant nematology*. CABI Publishing, pp. 4-27.
- Perry RN & Moens M (2011). Introduction to plant-parasitic nematodes; modes of parasitism. *In*: Jones J, Gheysen L and Fenoll C (eds.) *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London and New York, pp. 3-17.
- Perry RN & Wesemael WML (2008). Host plant effects on hatching of root-knot nematodes. *Russ. J. Nematol.* **16**: 1-5.
- Pfalz M, Vogel H, Mitchell-Olds T and Kroymann J (2007). Mapping of QTL for resistance against the crucifer specialist herbivore *Pieris brassicae* in a new *Arabidopsis* inbred line population, Da (1)-12 × Ei-2. *PLOS ONE* **2**: e578.
- Pfalz M, Vogel H and Kroymann J (2009). The gene controlling the *Indole Glucosinolate Modifier1* QTL alters indole glucosinolate structures and aphid resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 985-999.
- Pineda O, Bonierbale MW, Plaisted RL, Brodie BB and Tanksley SD (1993). Identification of RFLP markers linked to the *H1* gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Genome* **36**: 152-156.
- Ploeg AT (1999). Greenhouse studies on the effect of marigolds (*Tagetes spp.*) on four *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* **31**: 62-69.
- Ploeg AT (2002). Effects of selected marigold varieties on root-knot nematodes and tomato and melon yields. *Plant Dis.* **86**: 505-508.
- Popeijus H, Overmars H, Jones J, Blok V, Goverse A, Helder J, Schots A, Bakker J and Smant G (2000). Degradation of plant cell walls by a nematode. *Nature* **406**: 36-37.
- Potenza C, Thomas SH and Sengupta-Gopalan C (2001). Genes induced during early responses to *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible alfalfa cultivars. *Plant Sci.* **161**: 289-299.
- Prot JC (1975). Recherches concernant le déplacement des juvéniles de *Meloidogyne spp.* vers les racines. *Cah. ORSTOM, Sér. Biol.* **10**: 251-262.
- Puthoff DP, Nettleson D, Rodermeil SR and Baum TJ (2003). *Arabidopsis* gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profile. *Plant J.* **33**: 911-921.
- Puzio PS, Lausen J, Heinen P and Grundler FMW (2000). Promoter analysis of *pyk20*, a gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **157**: 245-255.
- Qin XF, Holuigue L, Horvath DM and Chua NH (1994). Immediate early transcription activation by salicylic acid via the cauliflower mosaic virus *as-1* element. *Plant Cell* **6**: 863-874.
- Radwan MA, Farrag SAA, Abu-Elamayem MM and Ahmed NS (2012). Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Appl. Soil Ecol.* **56**: 58-62.
- Rammah A & Hirschmann H (1988). *Meloidogyne mayaguensis* n.sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode from Puerto Rico. *J. Nematol.* **20**: 58-69.
- Rant JC, Arraiano LS, Chabannes M and Brown JKM (2013). Quantitative trait loci for partial resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Path.* **14**: 828-837.

- Ravi M & Chan SWL (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* **464**: 615-618.
- Raymundo SA (1985). Cropping systems research and root-knot nematode control. *In*: Sasser JN and Carter CC (eds.) An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol. I: Biology and Control. North Carolina State University Graphics, pp. 277-281.
- Rhoades HL (1982). Effect of temperature on survival of *Meloidogyne incognita* in flooded and fallow muck soil. *Nematropica* **12**: 33-37.
- Rhoades HL & Forbes RB (1986). Effects of fallow, cover crops, organic mulch and phenamiphos on nematode populations, soil nutrients and subsequent growth. *Nematropica* **16**: 141-151.
- Riggs RD & Winstead NN (1959). Studies on resistance in tomato to root-knot nematodes and on the occurrence of pathogenic biotypes. *Phytopathology* **49**: 716-724.
- Rivero L, Scholl R, Holomuzki N, Crist D, Grotewold E and Brkljacic J (2014). Handling Arabidopsis plants: growth, preservation of seeds, transformation, and genetic crosses. *Methods Mol. Biol.* **1062**: 3-25.
- Roberts PA (1982). Plant resistance in nematode pest management. *J. Nemat.* **14**: 24-33.
- Roberts PA (1992). Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. *J. Nematol.* **24**: 213-227.
- Rode H (1969). Über Verhalten und Reaktionsempfindlichkeit. Von Larven des Kartoffelnematoden gegenüber thermischen Reizgefällen im überoptimalen Temperaturbereich. *Nematologica* **15**: 510-524.
- Rode H (1970). Zur Orientierungsweise von Larven des Kartoffelnematoden in Temperaturgefällen. *Nematologica* **16**: 258-266.
- Rohde RA & McClure MA (1975). Autoradiography of developing syncytia in cotton roots infected with *Meloidogyne incognita*. *J. Nematol.* **7**: 64-69.
- Rodriguez-Käbana R, Morgan-Jones G, Godoy G and Gintis BO (1984). Effectiveness of species of *Gliocladium*, *Paecilomyces*, and *Verticillium* for control of *Meloidogyne arenaria* in field soil. *Nematotropica* **14**: 155-170.
- Rodriguez-Käbana R & Morgan-Jones G (1987). Biological control of nematode: Soil amendments and microbial antagonists. *Plant Soil* **100**: 237-247.
- Rodriguez-Käbana R, Morgan-Jones G and Chet I (1987). Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists. *Plant Soil* **100**: 237-247.
- Rodriguez-Käbana R (1992). Cropping systems for the management of phytonematodes. *In*: Gommers F J & Maas PWT (eds.) Nematology from molecule to ecosystem. Invergowrie, Dundee, Scotland: European Society of Nematologists, pp. 219-233.
- Ross H (1986). Potato breeding - problems and perspectives. *Z Pflanzenzüchtung*, Beiheft Nr. 13.
- Rossi M, Goggin FL, Milligan SB, Kaloshian I, Ullman DE and Williamson VM (1998). The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **18**: 9750-9754.
- Rosso MN, Favery B, Piotte C, Arthaud L, De Boer JM, Hussey RS, Bakker J, Baum TJ and Abad P, (1999). Isolation of a cDNA encoding a β -1,4-endoglucanase in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and expression analysis during plant parasitism. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**: 585-591.
- Rouppe van der Voort J, Wolters P, Folkertsma R, Hutten R, van Zandvoort P, Vinke H, Kanyuka K, Bendahmane A, Jacobsen E, Janssen R and Bakker J (1997). Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 874-880.
- Rouppe van der Voort J, Lindeman W, Folkertsma R, Hutten R, Overmars H, van der Vossen E, Jacobsen E and Bakker J (1998). A QTL for broad-spectrum resistance to cyst nematode species (*Globodera* spp.) maps to a resistance gene cluster in potato. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 654-661.
- Rouppe van der Voort J, Kanyuka K, van der Vossen E, Bendahmane A, Mooijman P, Klein-Lankhorst R, Stiekema W, Baulcombe D and Bakker J (1999). Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into cultivated potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**: 197-206.
- Rubinstein JH & Owens RG (1964). Thymidine and uridine incorporation in relation to the ontogeny of root-knot syncytia. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **22**: 491-502.
- Sandal NN, Salentijn EMJ, Kleine M, Cai D, Arens-de Reuver M, Van Druten M, de Bock TSM, Lange W, Steen P, Jung C, Marcker K, Stiekema WJ and Klein-Lankhorst RM (1997). Backcrossing of nematode-resistant sugar beet: a second nematode resistance gene at the locus containing *Hs1^{pro-1}*? *Mol. Breed.* **3**: 471-480.

- Sarathchandra SU, Watson RN, Cox NR, di Menna ME, Brown JA, Burch G and Neville FJ (1996). Effects of chitin amendment of soil on microorganisms, nematodes and growth of white clover (*Trifolium repens* L.) and (*Lolium perenne* L.). *Biol. Fertil. Soils* **22**: 221-226.
- Sasser JN & Carter CC (1985). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. **Vol. I**: Biology and Control. North Carolina State University Graphics, pp. 19-23.
- Sasser JN & Carter CC (1985). Overview of the international Meloidogyne project 1975-1984. *In*: Sasser JN & Carter CC (Eds.) An advanced treatise on Meloidogyne. Vol. I, Biology and control, North Carolina State University Graphics, pp: 19-24.
- Savitsky H (1978). Nematode (*Heterodera schachtii*) resistance and meiosis in diploid plants from interspecific *Beta vulgaris* × *B. procumbens* hybrids. *Can. J. Genet. Cytol.* **20**: 177–186.
- Sayre RM & Starr MP (1988). Bacterial diseases and antagonisms of nematodes. *In*: Poinar GO & Jansson HB (eds.) Diseases of nematodes. Vol. 1, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp. 69-101.
- Sayre RM & Starr MP (1985). *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore forming bacterium parasitic in plant parasitic nematodes. *Proc. Helminth. Soc. Wash.* **52**: 149-65.
- Schaff JE, Nielsen DM, Smith CP, Scholl EH and Bird D McK (2007). Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in *Mi*-mediated nematode resistance. *Plant Physiol.* **144**: 1079-1092.
- Schmidt AL, McIntyre CL, Thompson J, Seymour NP and Liu CJ (2005). Quantitative trait loci for root lesion nematode (*Pratylenchus thornei*) resistance in Middle-Eastern landraces and their potential for introgression into Australian bread wheat. *Aust. J. Agr. Res.* **56**: 1059-1068.
- Seymour DK, Filiault DL, Henry IM, Monson-Miller J, Ravi M, Pang A, Comai L, Chan SWL and Maloof JN (2012). Rapid creation of Arabidopsis doubled haploid lines for quantitative trait locus mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: 4227-4232.
- Sharma S, Sharma S, Kopisch-Obuch FJ, Keil T, Laubach E, Stein N, Graner A and Jung C (2011). QTL analysis of root-lesion nematode resistance in barley: 1. *Pratylenchus neglectus*. *Theor. Appl. Genet.* **122**: 1321-1330.
- Sharon E & Spiegel Y (1993). Glycoprotein characterization of the gelatinous matrix in the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *J. Nematol.* **25**: 585-589.
- Shearin ZP, Finnerty SL, Wood ED, Hussey RS and Boerma HR (2009). A southern root-knot nematode resistance QTL linked to the *T*-locus in soybean. *Crop Sci.* **49**: 467-472.
- Shen X, Van Becelaere G, Kumar P, Davis RF, May OL and Chee PW (2006). QTL mapping for resistance to root-knot nematodes in the M-120 RNR Upland cotton line (*Gossypium hirsutum* L.) of the Auburn 623 RNR source. *Theor. Appl. Genet.* **113**: 1539-1549.
- Shen X, He Y, Lubbers EL, Davis RF, Nichols RL and Chee PW (2010). Fine mapping *QMi-C11* a major QTL controlling root-knot nematodes resistance in Upland cotton. *Theor. Appl. Genet.* **121**: 1623-1631.
- Shindo C, Bernasconi G and Hardte C (2007). Natural Genetic Variation in Arabidopsis: Tools, Traits and Prospects for Evolutionary Ecology. *Ann. Bot.* **99**: 1043-1054.
- Shrestha R, Uzzo F, Wilson MJ and Price AH (2007). Physiological and genetic mapping study of tolerance to root-knot nematode in rice. *New Phytol.* **176**: 665-672.
- Sijmons PC, Grundler FMW, von Mende N, Burrows PR and Wyss U (1991). *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant-parasitic nematodes. *Plant J.* **1**: 245-254.
- Sijmons PC, Cardol EF and Goddijn OJM (1994). Gene activities in nematode-induced feeding structures. *In*: Daniels MJ, Downie JA and Osbourn AE (Eds.) Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. 3th edition, Kluwer academic publishers, pp. 333-38.
- Sikora RA (1988). Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. *Comm. Agr. Appl. Biol. Sci.* **53**: 867-878.
- Sikora RA & Fernandez E (2005). Nematode parasites of vegetables. *In*: Luc M, Sikora RA and Bridge J, (Eds.) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CABI Publishing, pp. 319-371.
- Sikora RA, Bridge J and Starr JL (2005). Management practices: an overview of integrated nematode management technologies. *In*: Luc M, Sikora RA and Bridge J (eds.) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CABI Publishing, pp. 793-820.
- Simon M, Olivier L, Durand S, Bérard A, Brunel D, Sennesal FX, Durand-Tardif M, Pelletier G and Camilleri C (2008). Quantitative trait loci mapping in five new large recombinant inbred line populations of *Arabidopsis thaliana* genotyped with consensus single-nucleotide polymorphism markers. *Genetics* **178**: 2253-2264.

- Sinha H, Nicholson BP, Steinmetz LM and McCusker JH (2006). Complex genetic interactions in a quantitative trait locus. *PLOS Genet.* **2**: e13.
- Smant G, Stokkermans JPWG, Yan Y, De Boer JM, Baum TJ, Wang X, Hussey RS, Gommers FJ, Henrissat B, Davis EL, Helder J, Schots A and Bakker J, (1998). Endogenous cellulases in animals: Isolation of b-1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4906-4911.
- Smant G & Jones J (2011). Suppression of plant defenses by nematodes. *In*: Jones J, Gheysen G and Fenoll C (eds.) Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions. Springer, Berlin, pp. 273-283.
- Smith PG (1944). Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* **44**: 413-416.
- Sobczak M, Avrova A, Jupowicz J, Phillips MS, Ernst K and Kumar A (2005). Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst nematode (*Globodera* spp.) infection of tomato lines in the absence and presence of the broadspectrum nematode resistance *Hero* gene. *Mol. Plant Microbe In.* **18**: 158–168.
- Spaull VW (1984). Observations on *Bacillus penetrans* infecting *Meloidogyne* in sugarcane fields in South Africa. *Revue Nématol.* **7**: 277-82.
- Speijer PR & De Waele D (1997). Evaluation du matériel génétique de *Musa* pour la résistance aux nématodes. Guides techniques INIBAP. INIBAP. Réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain, Montpellier, France, pp. 21-26.
- Spence KO, Lewis EE and Perry RN (2009). Host-finding and invasion by entomopathogenic and plant-parasitic nematodes: evaluating the ability of laboratory bioassays to predict field results. *J. Nematol.* **40**: 93-98.
- Starr MP & Sayre RM (1988). *Pasteuria thornei* sp. nov. and *Pasteuria penetrans sensu stricto* emend., mycelial and endospore-forming bacteria parasitic, respectively, on plant-parasitic nematodes of the genera *Pratylenchus* and *Meloidogyne*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **139**: 11-31.
- Steinmetz LM, Sinha H, Richards DR, Spiegelman JI, Oefner PJ, McCusker JH and Davis RW (2002). Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature* **416**: 326-330.
- Stewart GR, Perry RN and Wright DJ, (1993). Studies on the amphid specific glycoprotein gp32 in different life cycle stages of *Meloidogyne* species. *Parasitology* **107**: 573–578.
- Stirling AM, Stirling GR and Macrae IC (1992). Microbial degradation of fenamiphos after repeated application to a tomato-growing soil. *Nematologica* **38**: 245-254.
- Stirling GR (1985). Host specificity of *Pasteuria penetrans* within the genus *Meloidogyne*. *Nematologica* **31**: 203-209.
- Stirling GR (1991). Biological control of plant-parasitic nematodes. Wallingford, UK, CAB International. 282 pp.
- Sturhan D (1988). New host and geographical records of nematode parasitic bacteria of the *Pasteuriapenetrans* group. *Nematologica* **34**: 350-356.
- Sturhan D & Schneider R (1980). *Hirsutella heteroderae*, ein neuer Nematodenparasitärer Pilz. *Phytopathol. Z.* **99**: 105-115.
- Tamilarasan S & Rajam MV (2013). Engineering crop plants for nematode resistance through host-derived RNA interference. *Cell Dev. Biol.* **2**: 114.
- Tamulonis JP, Luzzi BM, Hussey RS, Parrot WA and Boerma HR (1997). RFLP mapping of resistance to southern root-knot nematode in soybean. *Crop Sci.* **37**: 1903-1909.
- Taylor AL & Sasser JN (1978). Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). A cooperative publication of the Department of Plant Pathology, North Carolina State University and the United States Agency for International Development, North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC, USA, pp: 37-38.
- The Arabidopsis Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.
- Thomason IJ & Smith PG (1957). Resistance of tomato to *Meloidogyne javanica* and *M. incognita acrita*. *Plant Dis. Rep.* **41**: 180-181.
- Toktay H, McIntyre CL, Nicol JM, Ozkan H and Elekcioğlu HI (2006). Identification of common root-lesion nematode (*Pratylenchus thornei* Sher et Allen) loci in bread wheat. *Genome* **49**: 1319-1323.
- Treub M (1885). Onderzoekingen over Sereh-Ziek Suikkeriet gedaan in s'Lands Plantentium te Buitenzorg. *Mededeelingen uit's Lands Plantentium, Batavia* **2**: 1–39.
- Triantaphyllou AC (1966). Polyploidy and reproductive patterns in the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *J. Morphol.* **118**: 403-413.

- Triantophyllou AC (1985). Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. *In*: Sasser JN & Carter CC (Eds.) An advanced treatise on Meloidogyne. Vol. I, Biology and control, North Carolina State University Graphics, pp: 113-126.
- Trudgill DL (1986). Yield losses caused by potato cyst nematodes: a review of the current position in Britain and prospects for improvements. *Ann. Appl. Biol.* **108**: 181-198.
- Trudgill DL (1991). Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **29**: 167-193.
- Trudgill DL (1995). An assessment of the relevance of thermal time relationships to nematology. *Fund. Appl. Nematol.* **18**: 407-417.
- Tzortzakakis EA & Gowen SR (1994). The evaluation of *Pasteuria penetrans* alone and in combination with oxamyl, plant resistance and solarization for control of *Meloidogyne* spp. on vegetables grown in greenhouses of Crete. *Crop Prot.* **13**: 455-62.
- United States Environmental Protection Agency (1993). Protection of stratospheric ozone. Federal Register **58**: 15,014-15,049.
- van der Vossen EAG, Rouppe van der Voort JNAM, Kanyuka K, Bendahmane A, Sandbrink H, Baulcombe DC, Bakker J, Stiekema WJ and Klein-Lankhorst RM (2000). Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant J.* **23**: 567-576.
- Vanholme B, Kast P, Haegeman A, Jacob J, Grunewald W and Gheysen G (2009). Structural and functional investigation of a secreted chorismate mutase from the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii* in the context of related enzymes from diverse origins. *Mol. Plant Pathol.* **10**: 189-200.
- Vercauteren I, Van Der Schueren E, Van Montagu M and Gheysen G (2001). *Arabidopsis thaliana* genes expressed in the early compatible interaction with root-knot nematodes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 288-299.
- Vercauteren I, de Almeida Engler J, De Groodt R and Gheysen G (2002). An *Arabidopsis thaliana* pectin acétylsterase gene is upregulated in nematode feeding sites induced by root-knot and cyst nematodes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 404-407.
- Veremis JC & Roberts PA (1996a). Differentiation of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* novel resistance phenotypes in *Lycopersicon peruvianum* and derived bridge-lines. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 960-967.
- Veremis JC & Roberts PA (1996b). Relationships between *Meloidogyne incognita* resistance genes in *Lycopersicon peruvianum* differentiated by heat sensitivity and nematode virulence. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 950-959.
- Veremis JC & Roberts PA (1996c). Identification of resistance to *Meloidogyne javanica* in the *Lycopersicon peruvianum* complex. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 894-901.
- Veremis JC, van Heusden AW and Roberts PA (1999). Mapping a novel heat-stable resistance to *Meloidogyne* in *Lycopersicon peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 274-280.
- Veremis JC & Roberts PA (2000). Diversity of heat-stable genotype specific resistance of *Meloidogyne* in Maranon races of *Lycopersicon peruvianum* complex. *Euphytica* **111**: 9-16.
- Veronico P, Jones J, Di Vito M and De Giorgi C, (2001). Horizontal transfer of a bacterial gene involved in polyglutamate biosynthesis to the plant-parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*. *FEBS Lett.* **508**: 470-474.
- Vlieghe K, Boudolf V, Beemster GTS, Maes S, Magyar Z, Atanassova A, de Almeida Engler J, de Groodt R, Inzé D and De Veylder L (2005). The DP-E2F-like gene DEL1 controls the endocycle in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* **15**: 59-63.
- Vos P, Simons G, Jesse T, Wijbrandi J, Heinen L, Hogers R, Frijters A, Groenendijk J, Diergaarde P, Reijans M, Fierens-Onstenk J, de Both M, Peleman J, Liharska T, Hontelez J and Zabeau M (1998). The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nat. Biotechnol.* **16**: 1365-1369.
- Vovlas N, Mifsud D, Landa BB and Castillo P (2005). Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. *Plant Pathol.* **54**: 657-664.
- Walker M, Hall A, Anderson RM and Basáñez MG (2009). Density-dependent effects on the weight of female *Ascaris lumbricoides* infections of humans and its impact on patterns of egg production. *Parasite Vector* **2**: 11.
- Wallace HR (1961). The orientation of *Ditylenchus dipsaci* to physical stimuli. *Nematologica* **6**: 222-236.
- Wang C, Ulloa M, Mullens RT, Yu JZ and Roberts PA (2012a). QTL analysis for transgressive resistance to root-knot nematode in interspecific cotton (*Gossypium* spp.) progeny derived from susceptible parents. *PLOS ONE* **7**: e34874.
- Wang CW, Stromhaug PE, Kauffman EJ, Weisman LS and Klionsky DJ (2003b). Yeast homotypic vacuole fusion requires the Ccz1-Mon1 complex during the tethering/docking stage. *J. Cell. Biol.* **163**: 973-985.

- Wang S, Basten CJ and Zeng ZB (2012b). Windows QTL cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC, (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>).
- Wang Z, Potter RH and Jones MGK (2003a). Differential display analysis of gene expression in the cytoplasm of giant cells induced in tomato roots by *Meloidogyne javanica*. *Mol. Plant Pathol.* **4**: 361-371.
- Watson RT, Albritton DL, Anderson SO and Lee-Bapty S (1992). Methyl bromide: its atmospheric science, technology and economics. Montreal Protocol Assessment Supplement. United Nations Environmental Programme. Nairobi, Kenya.
- Webb DM, Baltazar BM, Rao-Arelli AP, Schupp J, Clayton K, Keim P and Beavis WD (1995). Genetic mapping of soybean cyst nematode race-3 resistance loci in the soybean PI 437,654. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 574-581.
- Weiland JJ & Yu MH (2003). A cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker associated with root-knot nematode resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) *Crop Sci.* **43**: 1814-1818.
- Weischer B (1959). Experimentelle Untersuchungen über die Wanderung von Nematoden. *Nematologica* **4**: 172-186.
- Wiggers RJ, Starr JL and Price HJ (1990). DNA content and variation in chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Phytopathology* **80**: 1391-1395.
- Williams KJ, Willshire KL, Olson S, Matic M and Kuchel H (2006). Mapping of a novel QTL for resistance to cereal cyst nematode in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **112**: 1480-1486.
- Williamson VM (1999). Plant nematode resistance genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 327-331.
- Williamson VM & Gleason CA (2003). Plant-nematode interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 327-333.
- Williamson VM & Roberts PA (2009). Mechanisms and genetics of resistance. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (eds.), Root-Knot Nematodes, CAB International, Wallingford, UK, pp. 301-325.
- Wilson IW, Schiff CL, Hughes DE and Somerville SC (2001). Quantitative trait loci analysis of powdery mildew disease resistance in the *Arabidopsis thaliana* accession Kashmir-1. *Genetics* **158**: 1301-1309.
- Wu X, Blake S, Sleper DA, Shannon JG, Cregan P and Nguyen HT (2009). QTL, additive and epistatic effects for SCN resistance in PI 437654. *Theor. Appl. Genet.* **118**: 1093-1105.
- Wu Y, Jenkins T, Blunden G, von Mende N and Hankins SD (1998). Suppression of fecundity of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, in monoxenic cultures of *Arabidopsis thaliana* treated with an alkaline extract of *Ascophyllum nodosum*. *J. Appl. Phycol.* **10**: 91-94.
- Xu X, Zeng L, Tao Y, Vuong T, Wan J, Boerma R, Noe J, Li Z, Finnerty S, Pathan SM, Shannon JG and Nguyen HT (2013). Pinpointing genes underlying the quantitative trait loci for root-knot nematode resistance in palaeopolyploid soybean by whole genome resequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**: 13469-13474.
- Xu Y (2010). Molecular plant breeding. CAB International, Wallingford, UK, pp.: 11, 46-58, and 131-138.
- Yaghoobi J, Kaloshian I, Wen Y and Williamson VM (1995). Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 457-464.
- Yamamoto T & Hayashi T (2002). New root-knot nematodes resistance genes and their STS markers in peach. *Sci. hort.* **96**: 81-90.
- Yan Y, Smant G, Stokkermans J, Qin L, Helder J, Baum T, Schots A and Davis E (1998). Genomic organization of four beta-1,4-endoglucanase genes in plant-parasitic cyst nematodes and its evolutionary implications. *Gene* **220**: 61-70.
- Young LD (1992). Problems and strategies associated with long-term use of nematode resistant cultivars. *J. Nemat.* **24**: 228-233.
- Zacheo G, Orlando C and Bleve-Zacheo T (1993). Characterization of anionic peroxidases in tomato isolines infected by *Meloidogyne incognita*. *J. Nematol.* **25**: 249-256.
- Zeck WM (1971). A rating scheme for field evaluation of root-knot nematode infestations. *Pflanzen-Nachrichten Bayer AG* **24**: 141-144.
- Zhang Z, Ober JA and Kliebenstein DJ (2006). The gene controlling the quantitative trait locus *EPITHIOSPECIFIER MODIFIER1* alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1524-1536.
- Zhou T, Gao C, Du L, Feng H, Wang L, Lan Y, Sun F, Wei L, Fan Y, Shen W and Zhou Y (2014). Genetic analysis and QTL detection for resistance to white tip disease in rice. *PLOS ONE* **9**: e106099.
- Zwart RS, Thompson JP and Godwin ID (2005). Identification of quantitative trait loci for resistance to two species of root-lesion nematode (*Pratylenchus thornei* and *P. neglectus*) in wheat. *Aust. J. Agr. Res.* **56**: 345-352.

- Zwart RS, Thompson JP, Sheedy JG and Godwin ID (2006). Mapping quantitative trait loci for resistance to *Pratylenchus thornei* from synthetic hexaploid wheat in the International Triticeae Mapping Initiative (ITMI) population. *Aust. J. Agr. Res.* **57**: 525-530.
- Zwart RS, Thompson JP, Milgate AW, Bansal UK, Williamson PM, Raman H and Bariana HS (2010). QTL mapping of multiple foliar disease and root-lesion nematode resistances in wheat. *Mol. Breed.* **26**: 107-124.